



HAL
open science

Distribution cellulaire de la protéine de la nucléocapside NCp7 du VIH-1 et caractérisation de son interaction avec la protéine nucléolaire hNoL12

Sarwat Zgheib

► **To cite this version:**

Sarwat Zgheib. Distribution cellulaire de la protéine de la nucléocapside NCp7 du VIH-1 et caractérisation de son interaction avec la protéine nucléolaire hNoL12. Virologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ076 . tel-01424214

HAL Id: tel-01424214

<https://theses.hal.science/tel-01424214>

Submitted on 2 Jan 2017

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR CNRS 7213, Faculté de pharmacie, ILLKIRCH

THÈSE présentée par :

Sarwat ZGHEIB

soutenue le : 08 Décembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science du vivant/virologie

**Distribution cellulaire de la protéine de la
nucléocapside NCp7 du VIH-1 et
caractérisation de son interaction avec la
protéine nucléolaire hNoL12**

THÈSE dirigée par :

Dr. LESSINGER Jean-Marc
Dr. MELY Yves

Professeur, université de Strasbourg
Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. ARHEL Nathalie
Dr. JACOB Yves

Chargé de recherches, CNRS
Chargé de recherches, Institut Pasteur

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. MOOG Christiane
Dr. PARISSI Vincent

Directeur de recherches, INSERM
Chargé de recherches, CNRS

A Hassan,

*Pour tout l'amour, le bonheur et le
soutien que tu m'apportes*

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres de jury, Dr. Yves JACOB, Dr. Nathalie ARHEL, Dr. Vincent PARISSI et Dr. Christiane MOOG d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie mon directeur de thèse, le professeur Jean-Marc LESSINGER, pour ses conseils et son expertise scientifique.

Je remercie mon co-directeur de thèse, le professeur Yves MELY pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour votre disponibilité et vos conseils scientifiques.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à Eléonore, qui m'a permis d'entrer dans le monde de la recherche. Depuis mon master, tu étais toujours disponible pour m'encourager, me soutenir et m'orienter vers ce qu'il y a de mieux pour moi. Merci pour avoir partagé ton expérience et ta rigueur scientifique avec moi. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait.

J'adresse également mes remerciements à Halina. Je te remercie pour les journées que tu as passées avec moi au confocal et ta disponibilité pour répondre à mes questions.

Je remercie Hugues de Rocquigny pour ses commentaires et ses conseils scientifiques rigoureux.

Merci à Emmanuel, pour son aide, pour tous ses conseils scientifiques et la richesse de nos discussions.

Merci à Kamal, pour son aide dans la production et la purification de la protéine hNoL12, son soutien et sa bonne humeur.

Merci à Youri, pour son aide dans la microscopie AFM.

Merci à Julien, pour son aide et pour tous ses conseils scientifiques.

Un grand merci à Nicolas, qui m'a appris la spectroscopie ainsi que la valeur d'une cuvette. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Merci à Ingrid et Marlyse pour leur grande disponibilité et leur aide sur le plan administratif

Je remercie Romain Vauchelles pour son assistance sur la plateforme d'imagerie PIQ.

Merci à Mme Claudine Ebel (IGBMC) pour l'aide apportée lors des expériences de cytométrie.

Merci au Dr. Sophie Martin pour ses conseils dans les expériences de RT-qPCR

Une immense merci à Nedal, avec qui j'ai beaucoup partagé. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien et ton amitié. Ton départ a laissé un grand vide dans le bureau. Je te souhaite pleins de bonheur et de succès.

Merci au grand Manu ``mon prof de français'' et mon collègue préféré qui me démotive tous les jours. Je n'oublierai jamais nos discussions, nos engueulades et nos fous rires. Je te souhaite bon courage pour la thèse. N'oublie pas de m'inviter à ta soutenance.

Je souhaite également remercier chaleureusement les autres membres de laboratoire, Andrey, Andreas, Fred, Mayeul ainsi que les collègues encore présents ou déjà partis vers une nouvelle aventure Liliana, Redouane, Salah, Hassan, Marianna, Hala, Noémie, Lesia, Avissek, Rajhan, Waseem, Vasyl, Iryna, Katia, Sacha.

Je remercie mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue. Que cette thèse soit le fruit de votre patience et de l'éducation que vous m'avez offerts. Je vous remercie du fond de mon cœur.

Je remercie mon frère Nayef et ma sœur Zeina pour qui j'ai toujours été la petite sœur protégée. Merci pour votre amour et soutien inconditionnel.

Un immense merci à mon mari Hassan ``mon ange gardien''. Tu as apporté à ma vie une belle brise de bonheur, d'amour et de stabilité. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé durant ces trois années. Que dieu te garde pour moi mon amour.

Liste des abréviations

2AP	2- aminopurine
a.a.	Acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFM	Atomic force microscopy
AIE	Anémie Infectieuse des Equidés
ALIX	Apoptosis-Linked gene 2 Interacting protein X
AN	Acide nucléique
AP-1	Activator protein 1
APOBEC	APolipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide
APOBEC3G/F	Apolipoprotein B mRNA-Editing enzyme-Catalytic polypeptide-like 3G/F
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNi ou siRNA	ARN interférant, silencing RNA
ARNm	ARN messenger
ARNpII	ARN polymérase II
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ARNt^{Lys3}	isoaccepteur de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ARNv	ARN viral
ART	Anti retroviral therapy
ARV	Anti rétroviraux
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine
BAF	Barrier-to-autointegration
BMH	Branched Multiple Hairpin
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CA	Protéine de Capside
CBP	p300/CREB Binding Protein
CCR5	Chemokine CC motif Receptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CDK9	Cyclin-Dependant Kinase 9
CMF	Cytométrie en Flux
CMHI	Complexe majeur d'Histocomptabilité de classe I
CMV	Cytomegalovirus
co-IP	co-immunoprécipitation
CPP	Cell Penetrating Peptide
CRFs	Circulating Recombinant Forms
Crm1	Chromosome maintenance 1
Ct	Threshold cycle
CTD	C-terminal Domain
CXCR4	Chemokine CXC motif receptor 4
CypA	Cyclophiline A
DA	Domaine d'activation

DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DIS	Dimerisation Initiation Site
DLA	Domaine de liaison à l'ADN
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO600	densité optique à 600 nm
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Env	Gène codant les protéines d'enveloppe
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
ESE	Exonic Splicing Enhancers
ESS/ISS	Exonic/Intronic Splicing Silencers
FDA	Food and Drug Administration
FIAsH-EDT2	fluorescein arsenical hairpin binder-ethanedithiol
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Gag	Group-specific antigen
Gag-Pol	Polyprotéine de structure et enzymatique
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GTP/GDP	guanosine 5'-triphosphate/diphosphate
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HBR	Highly basic region
hDlg1	Human disc large 1 protein
His	Histidine
HMG1 (Y)	High mobility group protein
HRP	Horseradish peroxidase
HTLV-III	Human T-cell Lymphotropic Virus type III
IC50	Concentration Inhibitrice médiane
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	Immunofluorescence
IHF	Integration host factor
IL	Interleukine
IN	Intégrase
INNTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidiques de la transcriptase inverse
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kb	kilobase
LAV	Lymphadeno Associated Virus
LB	Lysogeny Broth
LDI	Long Distance Interaction
LEDGF/p75	Lens Epithelium-derived Growth Factor -75kDa
Leu	Leucine
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Protéine de Matrice

MceI	mRNA capping enzymes 1
MHR	Major/main Homology Region
min	Minute
mRFP	Monomeric Red Fluorescent Protein
MuLV	Murine Leukemia Virus
MVB	MultiVesicular bodies
Myr (c)	Myristate caché
Myr (e)	Myristate exposé
Myr	Myristate
NC	Nucléocapside
NCp7	Protéine de la nucléocapside
Nef	Negative Regulatory Factor
NELF	Negative Elongation Factor
NES	Nuclear Export Signal
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
NRE	Negative Regulatory Element
NTD	N-terminal Domain
Nup	Nucléoporine
ODN	Oligonucléotide
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PALM	Photo activation localization microscopy
PBS	Primer Binding Site
PCAF	P300/CBP-Associated Factor
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PEI	Poly Ethylène Imine
PFA	ParaFormAldéhyde
PI (4, 5) P2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIC	Preintegration complex
Pol	Polymérase
PPT	Polypurine Tract
PPTc	PolyPurine Tract central
PR	Protéase
PrP	Prion Protein
Psi	Packaging Signal
P-TEFb	Positive Elongation Factor b
PVDF	Polyvinylidène fluoride
qRT-PCR	Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction
RE	Réticulum Endoplasmique
Rev	Regulator of Virion Expression
RNase H	Ribonucléase H
rpm	Rotation par minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RRE	Rev Responsive Element
RT	Réverse Transcriptase
RTC	Reverse Transcriptase Complexe
SD	Splicing Domain

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIDA	Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise
SIVcpz	virus de l'immunodéficience simien du chimpanzé
SIVsm	virus de l'immunodéficience simien du sooty mangabey
SL	Stem Loop
SP1	Spacer peptide 1
SP2	Spacer peptide 2
SV40	Simian vacuolating virus 40
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAR	Trans-Acting Responsive element
Tat	TransActivator of Transcription
TBS-T	Tris Saline Buffer-Tween
TC	TétraCystéine
TNPO3	Transportin 3
Trp	Tryptophane
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
U3	Séquence unique en 3' de l'ARN génomique
U5	Séquence unique en 5' de l'ARN génomique
UNAIDS	The United Nations Joint Programme on HIV/AIDS
UNG2	Uracil-DNA glycosylase 2
UTR	Untranslated Region
VIB	Virus de l'Immunodéficience Bovine
Vif	Viral Infectivity Factor
VIF	Virus de l'Immunodéficience Féline
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U
Vpx	Viral protein X
VSV-G	Glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire
WB	Western Blot
WT	Wild type
ZF	Zinc finger
Zn	Zinc

Table des matières

I. INTRODUCTION	5
I.1. Virus de l'immunodéficience humaine VIH-1	7
I.1.1. Classification du VIH-1	7
I.1.2. Historique du VIH-1.....	7
I.1.3. Origine, évolution phylogénique et épidémiologie	8
I.1.4. Mode de transmission	10
I.1.5. Infection par le VIH-1	11
I.1.6. Thérapie anti-retrovirale.....	12
I.2. La structure du VIH-1	14
I.2.1. Structure de la particule virale mature	14
I.2.2. Le génome viral.....	15
I.2.2.1. L'ARN viral	15
I.2.2.2. L'ADN proviral	18
I.2.3. Les protéines virales	20
I.2.3.1. Les protéines d'enveloppe	20
I.2.3.2. Les polyprotéines de structure Gag et Gag-Pol.....	20
I.2.3.3. Les protéines de structure	21
I.2.3.3.1. La matrice (MA)	21
I.2.3.3.2. La capsid (CA)	23
I.2.3.3.3. La nucléocapsid (NC)	23
I.2.3.3.4. La protéine p6	24
I.2.3.3.5. Les peptides SP1 et SP2	24
I.2.3.4. Les protéines enzymatiques.....	24
I.2.3.4.1. La protéase (PR)	24
I.2.3.4.2. La transcriptase inverse (RT)	25
I.2.3.4.3. L'intégrase (IN)	26
I.2.3.5. Les protéines régulatrices	26
I.2.3.5.1. La protéine Tat (Transactivator of Transcription)	26
I.2.3.5.2. La protéine Rev (Regulatory of Viral Expression)	27
I.2.3.6. Les protéines auxiliaires	28
I.2.3.6.1. La protéine Nef (Negative Regulatory Factor).....	28
I.2.3.6.2. La protéine Vif (Virion Infectivity Factor)	28

I.2.3.6.3. La protéine Vpr (Viral Protein R)	29
I.2.3.6.4. La protéine Vpu (Viral Protein U)	30
I.3. Le cycle réplcatif du VIH-1.....	31
I.3.1. Entrée du virus	32
I.3.2. La décapsidation	33
I.3.3. La Transcription inverse	34
I.3.4. Import nucléaire et intégration	36
I.3.5. L'expression du génome viral	40
I.3.6. Epissage, export nucléaire et traduction des ARNm viraux	42
I.3.7. Traduction	44
I.3.8. Assemblage	45
I.3.9. Bourgeonnement et maturation de la particule virale	46
I.4. La protéine de la nucléocapside NCp7.....	48
I.4.1. Du précurseur Gag à la protéine NCp7	48
I.4.2. Structure de la NCp7	49
I.4.3. La liaison de la NCp7 aux acides nucléiques	50
I.4.4. Activité chaperonne de la NCp7	51
I.4.5. Les fonctions de NC dans le cycle viral du VIH-1.....	53
I.4.5.1. Les fonctions de la NCp7 dans la phase précoce.....	53
I.4.5.1.1. Rôle de la NCp7 au cours de la transcription inverse.....	53
I.4.5.1.2. Rôle de la NCp7 dans l'intégration de l'ADN viral	56
I.4.6. Les fonctions de la protéine de nucléocapside dans la phase tardive	56
I.4.6.1. Rôle du domaine NC de Gag au cours de l'encapsidation du génome viral.....	56
I.4.6.2. Rôle du domaine NC de Gag dans la dimérisation du génome viral	57
I.4.6.2.1. Rôle du domaine NC de Gag dans l'assemblage du virus	59
I.4.7. Interactions de la nucléocapside avec les protéines cellulaires	60
I.4.8. Les inhibiteurs ciblant les fonctions de la NCp7	61
II. LES OBJECTIFS DE LA THESE	65
III. MATERIELS ET METHODES	71
III.1. Matériels.....	73
III.1.1. Les cellules	73
III.1.2. Les peptides	73
III.1.3. Les plasmides utilisés	74
III.1.4. Les anticorps primaires et secondaires utilisés.....	75

III.1.5. Les oligonucléotides.....	75
III.2. Méthodes	78
III.2.1. Biologie cellulaire.....	78
III.2.1.1. Culture cellulaire	78
III.2.1.2. Transfection cellulaire.....	78
III.2.1.3. Préparation des complexes peptides (PepE ou MP72)/Pep1.....	79
III.2.1.4. Etude de l'internalisation cellulaire des peptides par microscopie confocale et cytométrie en flux (CMF).....	79
III.2.1.5. Préparation des cellules pour l'analyse par CMF	80
III.2.1.6. Analyse par CMF de la capacité des peptides à inhiber une infection par des lentivirus	80
III.2.2. Protocoles d'imagerie cellulaire.....	81
III.2.2.1. Fixation des cellules	81
III.2.2.2. Immunofluorescence	82
III.2.2.3. Microscopie confocale	82
III.2.2.4. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	83
III.2.2.5. Microscopie à force atomique	84
III.2.3. Biochimie	85
III.2.3.1. Lyse des cellules	85
III.2.3.2. Dosage de Bradford.....	85
III.2.3.3. Immunoprécipitation (IP).....	86
III.2.3.4. SDS-PAGE et western blot.....	87
III.2.4. Production des vecteurs lentiviraux	88
III.2.4.1. Production virale	88
III.2.4.2. Marquage des lentivecteurs avec le dérivé de la fluoescéine FIAsh	88
III.2.4.3. Dosage de l'activité luciférase.....	89
III.2.5. Test d'infectivité et RT-qPCR.....	89
III.2.5.1. Extinction de l'expression de la protéine hNoL12 et infection des cellules HeLa	89
III.2.5.2. Extraction de l'ARN	90
III.2.5.3. Reverse transcription	90
III.2.5.4. PCR quantitative (qPCR)	90
III.2.6. Purification de la protéine hNoL12	91
III.2.7. Synthèse peptidique	92
III.2.8. Biologie moléculaire	93
III.2.8.1. Transformation de bactéries compétentes et purification de l'ADN plasmidique	93
III.2.8.2. Clonage Gateway	94
III.2.8.3. Mutagenèse	95
III.2.8.4. Double hybride chez la levure.....	95

III.2.9. Biophysique.....	96
III.2.9.1. Anisotropie de fluorescence	96
III.2.9.2. Spectroscopie de fluorescence	97
III.2.9.3. Test exonucléase basé sur la fluorescence de la 2-aminopurine.....	98
IV. RESULTATS.....	99
IV.1. Caractérisation de l'interaction entre la protéine virale NCp7 et son partenaire cellulaire hNoL12	101
IV.1.1. Introduction.....	103
IV.1.2. Manuscrit.....	109
IV.1.3. Discussions et perspectives	140
IV.2. Etude de la distribution cellulaire de la protéine de nucléocapside NCp7 du VIH-1	145
IV.2.1. Introduction.....	147
IV.2.2. Résultats	152
IV.2.3. Discussions et perspectives	160
IV.3. Caractérisation des peptides antiviraux ciblant la protéine de la nucléocapside NCp7 du VIH-1 ..	165
IV.3.1. Introduction.....	167
IV.3.2. Résultats	170
IV.3.3. Discussions et perspectives	175
V. CONCLUSION GENERALE	177
VI. REFERENCES	183

I. Introduction

I.1. Virus de l'immunodéficience humaine VIH-1

I.1.1. Classification du VIH-1

Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), (Barre-Sinoussi et al., 1983), est un membre de la sous-famille Orthoretrovirinae de la famille des Retroviridae du genre Lentivirus. Les rétrovirus sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive. Ils tiennent leur nom de la présence d'une enzyme virale particulière : la transcriptase inverse, qui permet la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN double brin qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte (Coffin et al., 1997). Le genre Lentivirus (latin: lenti signifie lent) fait quant à lui référence à la longue période d'incubation nécessaire avant la manifestation de leur pouvoir pathogène (Campbell and Robinson, 1998). Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par leur capacité à infecter des cellules quiescentes comme les macrophages et les monocytes (Vodicka, 2001). Selon la classification récente du Comité international de taxonomie des virus (ICTV) on trouve au sein des lentivirus cinq sérogroupes classés en fonction de l'hôte mammifère infecté : le VIB (Virus de l'Immunodéficience Bovine), le VIF (Virus de l'Immunodéficience Féline), l'AIE (Anémie Infectieuse des Equidés) et chez les primates le VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne) et le VIH pour l'Homme. Ce dernier se caractérise par une grande diversité, permettant le classement en deux sous-types : le VIH-1 et le VIH-2.

I.1.2. Historique du VIH-1

Les premiers cas cliniques d'infection par le VIH ont été observés en 1981 aux Etats-Unis. Les premiers rapports du CDC (Center of Disease Control, principale agence gouvernementale américaine en matière de protection de la santé publique) décrivent, chez de jeunes homosexuels, l'apparition d'infections rares telles que la pneumopathie à *Pneumocystis carinii* (Gottlieb et al., 1981), et de tumeurs touchant habituellement les personnes âgées telles que le sarcome de Kaposi (Friedman-Kien, 1981). Ces maladies, connues mais rares, ont été qualifiées de maladies opportunistes apparaissant suite à une diminution de l'activité du système immunitaire avec un effondrement de la population de lymphocytes T CD4+.

En 1983, l'équipe du Pr. Luc Montagnier à l'Institut Pasteur a isolé le virus à partir de ganglions lymphatiques d'un patient atteint d'une lymphoadénopathie cervicale. Le virus isolé est alors nommé le LAV pour Lymphadeno Associated Virus (Barre-Sinoussi et al., 1983). Cette découverte a été récompensée par l'attribution en 2008 du prix Nobel de médecine aux Professeurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (Lever and Berkhout, 2008).

En 1984, une autre groupe de recherche de l'institut national du cancer du Maryland aux Etats-Unis a annoncé l'isolement d'un nouveau rétrovirus nommé HTLV-III (Human T-cell Lymphotropic Virus type III) le décrivant comme responsable du SIDA (Gallo et al., 1984; Gallo et al., 1983; Popovic et al., 1984). Ce virus s'est révélé plus tard identique au LAV. En 1986, le Comité International de la nomenclature des Virus et de la Vaxonomie (ICTV) a donné à ce virus le nom de VIH à la place de LAV et HTLV-III.

Au cours de cette même année, un nouveau lentivirus a été isolé à partir de patients atteints du SIDA en Afrique de l'Ouest. Ce nouveau virus est très proche génétiquement du virus de l'immunodéficience simienne. Il a, plus tard, été montré qu'il présentait une progression plus lente vers le SIDA et une plus faible transmissibilité par rapport au VIH déjà décrit à ce moment (Marlink et al., 1994; Clavel et al., 1986). Comme il est également un agent causal du SIDA, il a été nommé VIH-2 (Clavel et al., 1986).

I.1.3. Origine, évolution phylogénique et épidémiologie

L'alignement des séquences du génome du VIH-1 et VIH-2 a indiqué que ces virus ne partagent que 60% d'homologie pour les parties les plus conservées (régions codants les polyprotéines Gag et Pol) et 30-40% pour les moins conservées (extrémités du génome par exemple) (Guyader et al., 1987). Les études phylogénétiques ont montré que le VIH-1 est le plus proche du virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé (SIVcpz) (**Figure 1**). Il a été suggéré que l'introduction du VIH-1 dans l'espèce humaine résulte d'une transmission inter-espèce. Cette transmission a été localisée dans le sud du Cameroun entre l'homme et des chimpanzés pour les groupes M et N (Bailes et al., 2003) et plus récemment entre des gorilles et l'homme pour les sous-groupes P et O (D'Arc et al., 2015). Ces contaminations étant fort probablement liées à l'ingestion de tissus infectés, des expositions à du sang contaminé, des morsures ou des blessures lors du dépeçage des animaux (Buonaguro et al., 2007). D'autre part, le VIH-2 (Reeves and Doms, 2002) serait apparu suite à une transmission inter-espèce avec des mangabeys (SIVsm) (**Figure 1**) (Hahn et al., 2000; Reeves and Doms, 2002). Le

VIH-1 est largement prédominant dans le monde, contrairement au VIH-2, qui est presque exclusivement localisé en Afrique de l'Ouest. En comparaison avec le VIH-1, le VIH-2 présente une progression plus lente vers le SIDA et une plus faible transmissibilité (moins infectieux). Ce virus possède également une longue période d'incubation entre la primo-infection et la manifestation de la maladie (Berry et al., 1998; Kanki et al., 1994; Gilbert et al., 2003).



Figure 1 : Origine simienne du VIH. (A) Le VIH-1 (groupes M et N) provient de virus de diverses communautés de chimpanzés, *Pan troglodyte* (B) Le VIH-2 provient du SIV du sooty mangabey, *Cercocebus atys* (C) Le phénogramme radial démontre l'étroite relation entre VIH et SIV. Les distances indiquent le degré relatif d'évolution (Stebbing et al., 2004).

Les souches caractérisées du VIH-1 sont classées en 4 groupes principaux : M, N, O et P.

- Le groupe M (Majoritaire) est le groupe responsable de la pandémie. Il est divisé en 9 sous-types (A-D, F-H, J, K) et il existe également plus de 40 formes recombinantes résultant de co-infection par plusieurs sous-types. Ces virus sont nommés CRF (Circulating Recombinant Forms) (Sharp and Hahn, 2011; Korber et al., 1995).
- Le groupe O (outlier), plus rare, représente moins de 1% des infections par le VIH-1 (Mourez et al., 2013). Il a été isolé chez des individus vivant au Gabon, au Cameroun et en Guinée équatoriale (Mauclere et al., 1997; Peeters et al., 1997). Ce groupe présente 65% d'homologie avec le groupe M (Yamaguchi et al., 2003; Takehisa et al., 1999).
- Le groupe N (New ou Non M, Non O) a été identifié en 1998 chez une femme au Cameroun (Delaugerre et al., 2011; Simon et al., 1998; Vallari et al., 2010). Ce groupe est fortement apparenté au SIV qui infecte les chimpanzés (Roques et al., 2004).
- Le groupe P (lettre choisie après M, N et O) a été découvert chez une femme camerounaise vivant en France (Plantier et al., 2009) et rapidement identifié comme proche de souches du SIV de gorilles représentant alors le premier isolat d'une nouvelle

branche du VIH-1. Depuis ce jour, un autre isolat du groupe P a été identifié aux Etats-Unis dans un prélèvement réalisé en 2006 chez une autre personne au Cameroun (Mourez et al., 2013).

Concernant le VIH-2, on dénombre sept sous-types (A-G) où le sous-type A est responsable de la majorité des infections (Reeves and Doms, 2002).

Depuis le début de l'épidémie, plus de 78 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 39 millions sont décédées de maladies liées au SIDA (chiffres UNAIDS-The Gap reporter 2014). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), 35 millions de personnes vivaient avec le VIH en 2013, dont 25 millions en Afrique Sub-Saharienne où le taux de mortalité par le VIH est le plus élevé.

I.1.4. Mode de transmission

Le VIH-1 est présent dans la plupart des sécrétions biologiques des personnes infectées, on retrouve le virus dans le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et aussi le lait maternel. Cependant, trois principales voies de transmission du VIH ont été identifiées. La majorité des infections par le VIH-1, ce qui représente environ 80%, sont attribuées à des contacts sexuels non protégés, soit hétérosexuels (70%) ou homosexuels (10%). La présence de lésions génitales ulcéreuses liées à d'autres maladies sexuellement transmissibles augmente considérablement la sensibilité à l'infection par le VIH-1 (Boily et al., 2009; Cohen, 2004; Galvin and Cohen, 2004). La voie sanguine, est également un facteur important de transmission (5%), cela peut avoir lieu lors de partage de matériel d'injection chez les toxicomanes, en cas d'accident d'exposition chez les personnels de santé, au cours d'une transfusion sanguine ou suite à une transplantation (Sleasman and Goodenow, 2003). La transmission verticale du VIH (mère-enfant) est responsable de plus de 90% des infections VIH chez les nourrissons et les enfants. Cela peut avoir lieu *in utero*, pendant l'accouchement, ou lors de l'allaitement. En absence de traitement, le taux de transmission mère-enfant du VIH est de 13% à 42 % (Cavarelli and Scarlatti, 2011).

I.1.5. Infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 se déroule en 3 temps (Figure 2) :

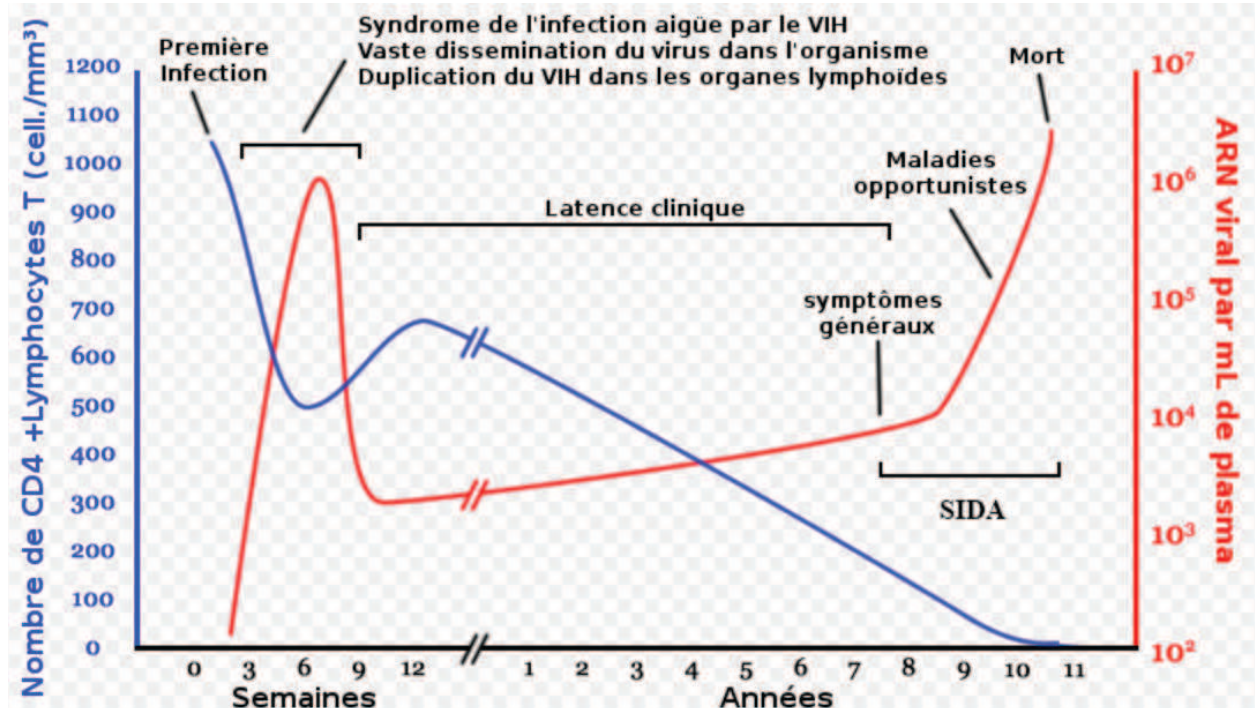


Figure 2 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1. La ligne bleue correspond à l'évolution du taux de lymphocytes T CD4+ et la ligne rouge correspond à la charge virale plasmatique. Au cours du temps, le taux des lymphocytes T CD 4+ diminue, à l'inverse la charge virale augmente. L'infection est caractérisée par 3 phases : la primo-infection, la latence clinique (infection chronique) et la phase SIDA (Ho et al., 1995).

Infection aiguë ou primo-infection

La primo-infection commence 3 à 6 semaines après l'exposition au VIH-1. Elle est associée à une répllication active du virus dans l'organisme (production de dix milliards de virions quotidiennement), ce qui entraîne une forte chute de lymphocytes T CD4+ (Huang et al., 2005). Parfois, des symptômes rappelant une mononucléose peuvent apparaître. Finalement, la réponse immunitaire de l'organisme permet de diminuer le taux de virus plasmatique. Au cours de la primo-infection les anticorps anti-VIH-1 ne sont pas encore présents dans le sang. Le diagnostic ne peut pas alors être effectué par des tests sérologiques classiques. Cependant, il peut être réalisé par détection de l'ARN viral ou de l'antigène p24 (protéine de la capsid du VIH) dans le plasma des personnes infectées. La séroconversion, apparition des anticorps anti-VIH dans le sang, marque la transition de cette phase à l'infection chronique (Kahn and Walker, 1998; Pantaleo et al., 1993).

La phase asymptomatique ou l'infection chronique

L'infection chronique est une longue période où aucun symptôme clinique n'est généralement observé. Le système immunitaire hyperactivé, compense partiellement la destruction massive des lymphocytes T CD4⁺ en augmentant leur production. Cette phase peut s'étaler sur une période de 10 ans avec une grande variabilité inter-patients (Pantaleo et al., 1993). Une caractéristique de cette phase est la persistante lymphadénopathie, qui coïncide avec une faible réplication virale dans les ganglions lymphatiques et l'accumulation des virions à la surface des cellules dendritiques folliculaires (Burton et al., 2002).

La phase symptomatique ou SIDA

Le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) est déclaré quand le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/ μ L (valeur normale de 600 à 1200 cellules/ μ L). A ce stade, la personne infectée développe des infections opportunistes et des pathologies tumorales (Lymphome non Hodgkinien ou sarcome de Kaposi) qui entraînent le décès du patient dans un intervalle moyen de neuf mois (Pantaleo et al., 1993).

I.1.6. Thérapie anti-retrovirale

Actuellement, aucun traitement ne permet d'éliminer complètement le VIH de l'organisme. Il est cependant possible de maîtriser l'infection et de garder un système immunitaire opérationnel. La thérapie antirétrovirale (= ART, appelée également thérapie antirétrovirale hautement active = HAART) permet la suppression et la réduction de la morbidité et de la mortalité (Adamson and Freed, 2008). Cette thérapie combine trois médicaments appartenant au moins à deux classes différentes, généralement deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) en association avec, soit un inhibiteur de la protéase, un inhibiteur de l'intégrase ou un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) (Arts and Hazuda, 2012; Este and Cihlar, 2010).

La Food and Drug Administration (FDA) américaine a approuvé à ce jour 34 médicaments antirétroviraux (ARV) pour le traitement de l'infection au VIH-1.

La plupart de ces médicaments ont des effets indésirables et sont métaboliquement toxiques, ce qui constitue la cause principale de non observance du traitement (Calmy et al., 2009; Carr, 2003). Les ARV actuellement disponibles sont classés en fonction de l'étape du cycle viral ciblée.

- Les inhibiteurs de fixation. Les antagonistes du CCR5 sont des inhibiteurs allostériques qui bloquent l'interaction du virus avec le récepteur CCR5 au niveau de la membrane cellulaire. Le premier antagoniste du CCR5 (Maraviroc) a été approuvé en 2007.
- Les inhibiteurs d'entrée (ou les inhibiteurs de fusion). En 2003, le premier inhibiteur de fusion (enfuvirtide) a été approuvé par la FDA, il cible la glycoprotéine virale gp41 empêchant la fusion des membranes virales et cellulaires.
- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) entrent en compétition avec les nucléotides naturels lors de la synthèse de l'ADN viral ce qui entraîne une inhibition de la transcription inverse, et de l'élongation de l'ADN viral neosynthétisé (Sharma et al., 2004).
- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) agissent par modification de la conformation du site actif de la transcriptase inverse (Sharma et al., 2004).
- Les inhibiteurs de l'intégrase inhibent l'enzyme intégrase et donc l'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules infectées.
- Les inhibiteurs de la protéase inhibent l'activité enzymatique de la protéase virale et interfèrent ainsi avec le clivage des polyprotéines virales lors de la maturation des nouveaux virions.

I.2. La structure du VIH-1

I.2.1. Structure de la particule virale mature

La structure du virus mature VIH-1 a été déterminée par microscopie électronique en 1987 (Gelderblom et al., 1987). Les virions sont des particules sphériques de 80 à 120 nm de diamètre (**Figure 3**). Ces particules sont formées d'une enveloppe externe constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire à laquelle sont associées les deux glycoprotéines virales la gp120 (glycoprotéine de surface, SU) et la gp41 (glycoprotéine transmembranaire, TM) associées en trimères de dimères de gp41-gp120 à la surface de la particule virale (Aloia et al., 1993; Checkley et al., 2011). Sous cette bicouche se trouve la matrice (MA) renfermant la capside virale conique, composée de protéines de capside (CA). La capside renferme le génome viral constitué de deux molécules d'ARN de 9,2kb. Ces ARN sont associés à la protéine de nucléocapside (NCp7), aux enzymes virales (Transcriptase inverse, Intégrase et Protéase) (Frankel and Young, 1998; Turner and Summers, 1999) et aux protéines auxiliaires Vpr, Vif et Nef (**Figure 3**). Un grand nombre de protéines et d'acides nucléiques cellulaires sont également encapsidés dans la particule virale telles que l'ARNt^{Lys3} (Kleiman et al., 2004), la cyclophilin A (Braaten et al., 1996b) et l'APOBEC3G (Zennou et al., 2004).

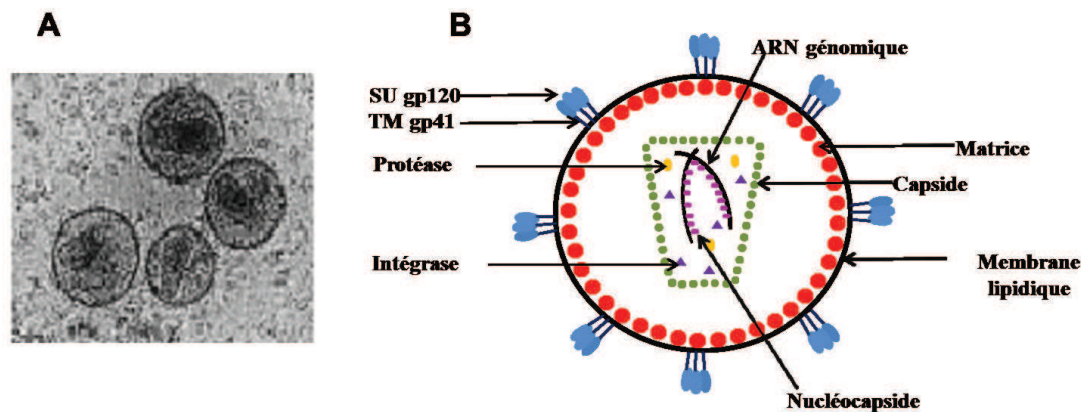


Figure 3 : Structure de la particule virale mature du VIH-1. (A) Particules virales matures observées par microscopie électronique. Adaptée de Gelderblom et al., 1987 (B) Représentation schématique de la particule virale du VIH-1.

I.2.2. Le génome viral

I.2.2.1. L'ARN viral

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies similaires d'ARN simple brin (9.2kb) de polarité positive. Les deux molécules d'ARN sont associées de manière non covalente au niveau de leurs extrémités 5'. L'architecture et la structure secondaire du génome ont été récemment résolues (Watts et al., 2009). Ces deux molécules d'ARN, issues de la transcription par l'ARN polymérase cellulaire, sont coiffées au niveau de leurs extrémités 5' et polyadénylées à leurs extrémités 3'.

Le génome viral comporte trois régions codantes principales, correspondant aux polyprotéines Gag, Pol et Env. Le génome code également pour les protéines régulatrices (Tat, Rev) qui sont impliquées dans la régulation de l'expression du génome viral et les protéines auxiliaires qui augmentent la réplication virale et sont à l'origine du pouvoir infectieux du virus (Nef, Vif, Vpr et Vpu) (**Figure 4**). Les régions codantes sont flanquées aux deux extrémités par des régions non codantes ou régions non traduites (UTR = UnTranslated Region): 5'-UTR et 3'-UTR (Coffin et al., 1997).

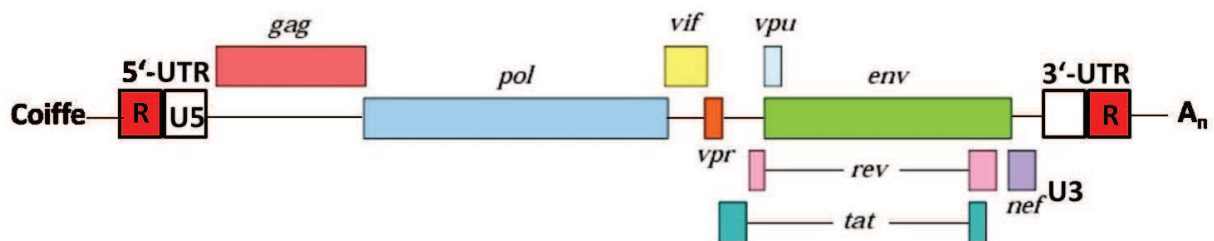


Figure 4 : Le génome du VIH-1. Le génome du VIH-1 est composé d'une région centrale codant les protéines de structure, les enzymes et les protéines accessoires. Aux deux extrémités du génome se trouvent des régions non codantes (5'UTR et 3'UTR).

Comme on le verra plus loin, l'ARN viral est copié en ADN proviral après la transcription inverse. Les séquences U3 et U5 sont dupliquées et les régions UTR deviennent des LTR (Long Terminal Repeat). Les deux LTR sont identiques et sont composées de trois séquences: U3, R et U5. Ces régions jouent un rôle très important dans l'intégration et la transcription de l'ADN viral (**Figure 5**) (Reicin et al., 1995).

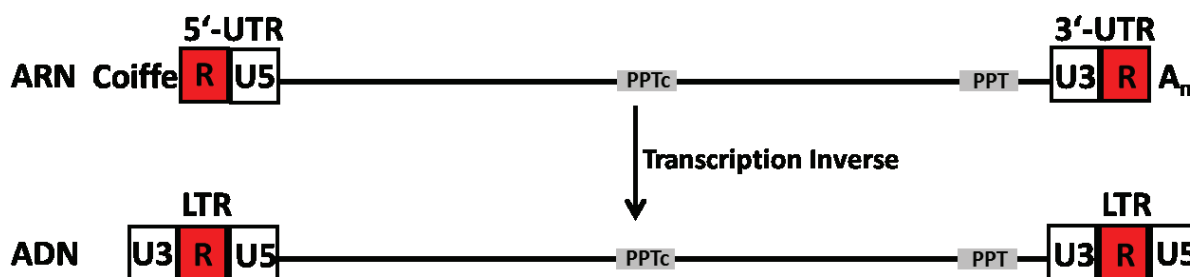


Figure 5 : ARN viral génomique et ADN proviral obtenu après la transcription inverse. Lors la transcription inverse, les séquences U3 et U5 des régions UTR de l'ARN viral sont dupliquées pour donner deux séquences LTR (Long Terminal Repeat) identiques aux extrémités de l'ADN proviral.

Les régions non codantes

La région 5'-UTR est la partie la plus conservée du génome du VIH-1. Elle est composée de nombreux motifs en tige-boucle qui sont impliqués dans différentes étapes du cycle réplcatif, telles que la transcription, la transcription inverse, l'épissage, la traduction, l'encapsidation de l'ARN génomique et sa dimérisation (Russell et al., 2004; Berkhout, 1996).

La région 5'-UTR comporte dans l'ordre : la séquence R (Repeat), U5 (unique en 5'), la séquence PBS (Primer Binding Site) en partie comprise dans U5 et le signal d'encapsidation ψ contenu dans une région appelée leader se terminant au niveau de l'AUG de début de traduction de Gag. Par ailleurs, la région 3'-UTR comporte U3 (unique en 3') et R (**Figure 6**).

La région R en 5' et 3'

La séquence R (positions +1 à +96 dans l'ADN de la souche HXB2) est composée de deux séquences en tige-boucle :

- La séquence TAR (Transactivation Response Element) composée de 57 nucléotides, joue un rôle essentiel dans l'activation transcriptionnelle du génome proviral, en association avec différentes protéines cellulaires et la protéine virale Tat (mécanisme détaillé dans la section I.3 de ce manuscrit) (Karn, 1999). TAR joue également un rôle important dans les étapes initiales de la transcription inverse (Harrich et al., 1996).
- La séquence poly(A) contenant le signal de polyadénylation (AAUAAA) induit l'addition de la queue poly (A) à l'extrémité 3' de l'ARNm. Malgré la présence de cette séquence aux deux extrémités de l'ARN viral, ce motif n'est fonctionnel qu'en 3' (Brown et al., 1991).

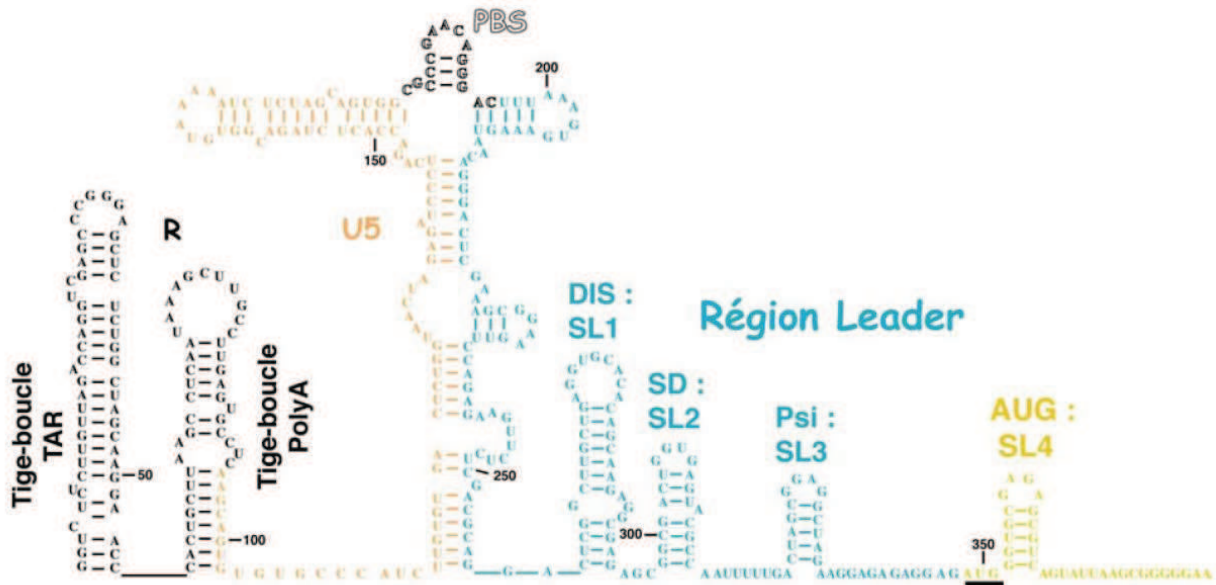


Figure 6 : Séquence et structure de la région 5'UTR du génome du VIH-1. Elle comporte dans l'ordre : la séquence R (Repeat, en noir), U5 (unique en 5', en orange), la séquence PBS (Primer Binding Site, en noir) en partie comprise dans U5 et le signal d'encapsidation ψ (dans SL3) contenu dans une région appelée leader (en bleu) se terminant au niveau de l'AUG de début de traduction de Gag. Adaptée de Berkhout, 1996.

La région U5 et PBS

La région U5 (unique en 5'), est une séquence de 85 nucléotides (positions +97 à +181 dans la souche HXB2) qui constitue la première séquence transcrite au cours de la transcription inverse. Immédiatement, en 3' de la région U5 se trouve la région PBS qui est composée de 18 nucléotides (positions +181 à +198 dans le génome de la souche HXB2). PBS s'associe à l'extrémité 3'OH de l'ARNt^{Lys3} qui sert d'amorce pour l'initiation de la transcription (Kleiman, 2002; Mak and Kleiman, 1997).

La région leader ou région ψ

Elle est comprise entre le PBS et le codon d'initiation de la traduction du gène *gag* (positions +236 à +336 dans le génome de la souche HXB2). Cette région comprend trois tiges-boucles complètes (SL1 à SL3) et le début d'une tige-boucle (SL4) portant l'AUG (**Figure 6**) (Clever and Parslow, 1997):

- SL1 contient le DIS (Dimer Initiation Site), une séquence palindromique de six nucléotides (GUGCAC), impliquée dans la dimérisation du génome viral via une interaction boucle-boucle (Kissing loop) avec le DIS d'une autre molécule d'ARN (Skripkin et al., 1994).

- SL2 qui possède un site donneur d'épissage majeur appelé « SD » où tous les transcrits du VIH-1, à l'exception de l'ARNm pleine-longueur, sont clivés générant ainsi les différents ARNm viraux.
- SL3 contient le signal d'encapsidation (ψ) essentiel à l'encapsidation préférentielle du génome lors de l'assemblage des particules virales. Cette séquence est très conservée parmi les différentes souches de VIH-1 (Lever et al., 1989).
- SL4 contient le codon d'initiation de la traduction du gène *gag*

Autres régions non codantes

Le PPT (Poly Purine Tract) et le PPTc (Poly Purine Tract central)

Le PPT (+8614 à +8638) et le PPTc (+4318 à 4350) sont des domaines riches en purine du génome viral. Le PPT se situe immédiatement en amont de la séquence U3 en 3' du génome viral, tandis que le PPTc est localisé dans le cadre ouvert de lecture du gène *pol*. Ces séquences sont résistantes à l'activité RNase H de la transcriptase inverse et servent d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+) lors de la transcription inverse (Charneau et al., 1992; Charneau and Clavel, 1991). Le PPTc est responsable de la formation de la structure Flap du complexe de pré-intégration (PIC) qui jouerait un rôle important dans l'import nucléaire du PIC (Arhel et al., 2007; Riviere et al., 2010; Zennou et al., 2004).

Le RRE (Rev Response Element)

La séquence RRE (+7710 à +8061) est une séquence hautement structurée située sur le gène *env*. Elle interagit avec la protéine Rev ce qui permet l'export nucléaire des ARNs non ou mono-épissés (Farjot et al., 1999; Fernandes et al., 2012).

I.2.2.2. L'ADN proviral

Les régions non-codantes

L'ADN proviral est bordé de deux séquences non codantes identiques ou LTR (Long Terminal Repeat). Ces extrémités sont importantes à la fois pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et pour sa transcription. Chaque LTR se subdivise en séquences U3, R et U5 (Unique en 5') (**Figure 5 et 7**).

La région U3 (positions -454 à 0 dans l'ADN de la souche HXB2) comporte l'ensemble des signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire. La région U3 est divisée en trois régions : le « core » du promoteur (dont toute altération diminue très fortement l'efficacité de transcription) contenant la boîte TATA et trois sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 ; un domaine activateur contenant deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF-κB et un domaine modulateur qui lie plusieurs facteurs transcriptionnels cellulaires stimulant pour la plupart la transcription. Toutefois, une région NRE (Negative Regulatory Element) dans le domaine modulateur régule de façon négative la transcription (Gaynor, 1992; Siekevitz et al., 1987).

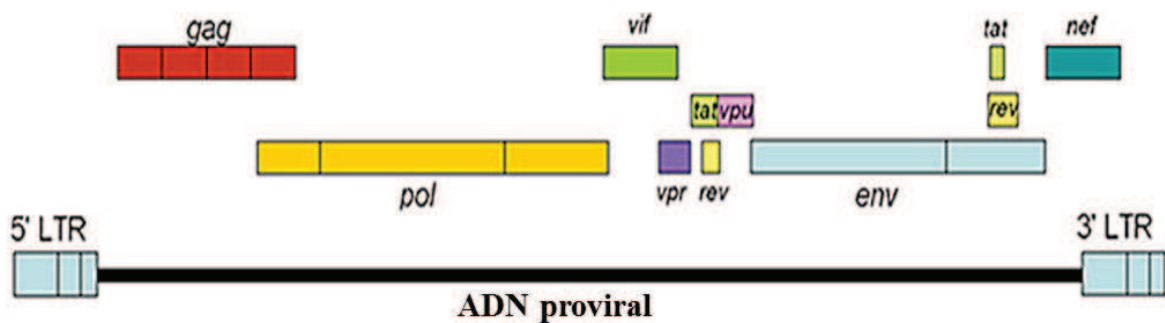


Figure 7 : Représentation schématique de l'ADN proviral du VIH-1. L'ADN viral est composé d'une région centrale codant les protéines d'enveloppe, protéines de structure, des enzymes et les protéines accessoires, flanquée à ses deux extrémités par des régions non codantes (5'LTR et 3'LTR)

Les régions codantes

L'ADN viral contient des régions codant trois polyprotéines majeures : Gag (Group specific antigen), Pol (polymerase) et Env (enveloppe), ainsi que des protéines régulatrices (Tat, Rev) et des protéines auxiliaires (Nef, Vif, Vpr, Vpu) (Frankel and Young, 1998; Freed, 2001) (**Figure 7**). Le clivage de Gag par la protéase virale donne différentes protéines de structure : la protéine de matrice (MA, p17), la protéine de capsid (CA, p24), la protéine de nucléocapsid (NCp7, p7), le peptide p6 et les peptides SP1 et SP2. Pol, quant à elle, donnera naissance à des protéines enzymatiques telles que la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Env, clivée par une protéase cellulaire, générera les deux glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41. Les différentes protéines du VIH-1 et leurs fonctions seront développées dans ce chapitre.

I.2.3. Les protéines virales

I.2.3.1. Les protéines d'enveloppe

Le gène Env code pour une polyprotéine glycosylée gp160 (obtenue par traduction de l'ARN messager viral mono-épissé). Elle est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, puis elle gagne l'appareil de Golgi où elle est clivée par une protéase cellulaire pour produire les glycoprotéines de surface gp120 (SU) et transmembranaire gp41 (TM) (Decroly et al., 1994; Moulard and Decroly, 2000). Ces deux glycoprotéines s'associent en dimères qui forment un complexe de trois dimères à la surface de la particule virale (Zhu et al., 2003).

La glycoprotéine de surface gp120

La glycoprotéine gp120, composée de 480 acides aminés (a.a.), permet l'attachement du virion à la cellule cible en se fixant à ses récepteurs CD4 (Abbas and Herbein, 2014). La gp120 est fortement glycosylée (20-35 sites de glycosylation) et est composée de cinq régions variables (V1 à V5) et de cinq régions conservées (C1 à C5) (Prabakaran et al., 2007).

La glycoprotéine transmembranaire gp41

La glycoprotéine gp41, composée de 345 a.a., est impliquée dans la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'entrée du virus dans la cellule. Elle est plus conservée que la gp120 et est composée de trois domaines : un domaine de fusion en N-terminal, une région transmembranaire et un domaine C-terminal qui interagit avec la protéine de matrice virale (Checkley et al., 2011).

I.2.3.2. Les polyprotéines de structure Gag et Gag-Pol

L'ARNm viral non épissé est traduit en polyprotéines Gag (55kDa, Pr55^{Gag}) et Gag-Pol (160kDa, Pr160^{Gag-Pol}). Pr55^{Gag} est traduite par une lecture du codon d'initiation jusqu'au premier codon de terminaison. La synthèse de Pr160^{Gag-Pol} est obtenue grâce à un décalage de lecture des ribosomes en fin de traduction de Pr55^{Gag} qui rend silencieux le premier codon stop. En général, la poursuite de la lecture au-delà du premier codon de terminaison est efficace à 5%. La protéine Gag est donc vingt fois plus abondante que la protéine Gag-Pol.

La protéine Gag (Group Specific Antigen) est une protéine myristoylée composée de plusieurs domaines qui, lors de la maturation du virus, est clivée au sein du virion par la protéase virale, selon un mécanisme complexe et fortement régulé (Konnyu et al., 2013; Pettit et al., 2005) (**Figure 8**). Pr160^{Gag-Pol} génère, en plus des produits de clivage de Gag, les protéines enzymatiques : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (Kohl et al., 1988).

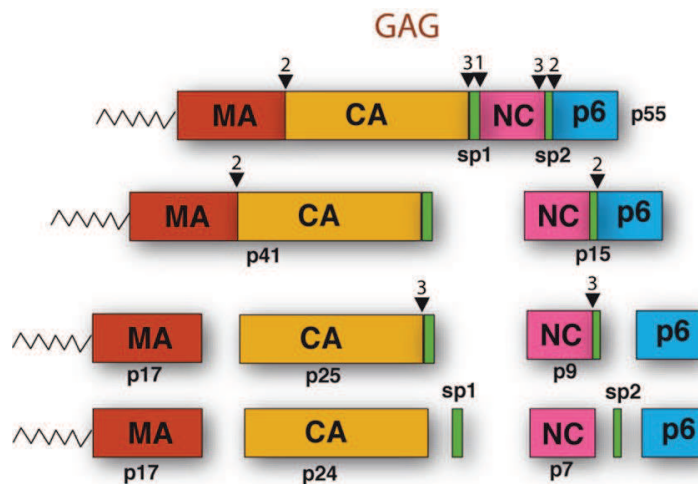


Figure 8 : Clivage protéolytique de Pr55^{Gag} chez VIH-1. Dans le cas du VIH-1, le précurseur Pr55^{Gag} subit plusieurs clivages protéolytiques séquentiels par la protéase virale, libérant différentes protéines de structure : CA (capside), MA (matrice) NC (nucléocapside), le peptide p6 et les deux peptides SP1 et SP2.

1.2.3.3. Les protéines de structure

1.2.3.3.1. La matrice (MA)

La protéine de matrice est une protéine de 132 acides aminés avec un poids moléculaire de 17kDa. Cette protéine multifonctionnelle intervient dans les phases précoces et tardives du cycle viral. Dans la particule virale mature, la protéine MA tapisse la surface interne de l'enveloppe virale (Frankel and Young, 1998). En tant que domaine de Gag, la MA permet l'adressage de Gag à la membrane plasmique où a lieu le processus d'assemblage. Deux déterminants structuraux du domaine MA semblent impliqués. Tout d'abord, un groupement myristate attaché sur une glycine à l'extrémité N-terminale de la protéine (Bryant and Ratner, 1990) permet à la MA de s'ancrer au feuillet interne de la membrane au niveau de régions riches en phospholipides de type PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol(4,5)biphosphate) (Ono et al., 2004; Saad et al., 2006). Cependant, le groupement myristate seul ne suffit pas pour établir

une liaison stable avec la membrane plasmique. En effet, ce groupement agit en synergie avec une plateforme basique (a.a. 26 à 32) appelée Highly Basic Region (HBR) pour faciliter l'ancrage de Gag à la membrane plasmique via des interactions électrostatiques avec les phospholipides de la membrane plasmique (Saad et al., 2006). En effet, des mutations altérant la plateforme basique ou la myristoylation induisent un défaut d'adressage de Gag à la membrane plasmique (Bukrinskaya, 2004; Ghanam et al., 2012).

De plus, la région MA de Gag existe sous formes monomère et trimère, dans lesquelles l'acide myristique est respectivement « caché, myr(c) » et « exposé, myr(e) ». La conformation myr(c) aurait une faible affinité pour la membrane et une forte affinité pour l'ARN, contrairement à myr(e). A forte concentration, lors de l'attachement de MA à la membrane, le groupement myr devient exposé (myristyl switch), ce qui stabilise la forme trimère (**Figure 9**). Ceci induit une réorganisation structurale de Gag ainsi que sa localisation dans des microdomaines membranaires favorables au bourgeonnement (Tang et al., 2004). Par conséquent, la multimérisation du Gag est couplée à une liaison efficace à la membrane plasmique grâce à l'exposition du groupement myristate (Resh, 2004).

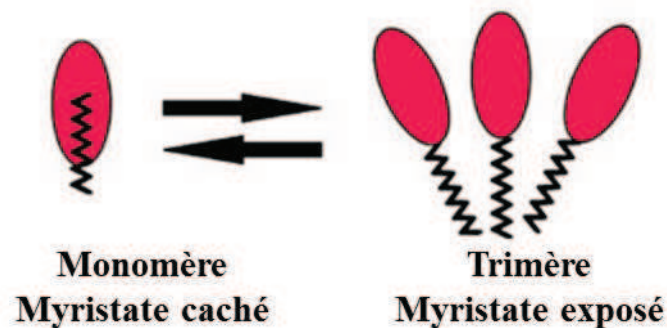


Figure 9: Conversion du myristate. Dans la forme monomérique de Gag, le groupement myristate est caché à l'intérieur du domaine MA de Gag (myr(c)). La trimérisation de Gag permet l'exposition du groupement myristate (myr(e)). Adaptée de Resh, 2004.

De plus, le domaine MA de Gag est nécessaire pour l'incorporation des protéines gp120/gp41 dans les particules virales. L'interaction avec MA se faisant via la queue cytoplasmique de gp41 (Dorfman et al., 1994; Freed and Martin, 1996). Le domaine basique de MA participe également à la liaison et l'encapsidation des ARNs viraux et cellulaires (Burniston et al., 1999; Ott et al., 2005).

I.2.3.3.2. La capsid (CA)

La protéine mature de la capsid (CA, p24) est constituée de 231 a.a. et présente un poids moléculaire de 24kDa. Environ 2000 molécules de CA disposées en hexamères forment la capsid virale. La CA se subdivise structurellement en deux domaines: le domaine N-terminal (NTD) et le domaine C-terminal (CTD) reliés par une portion flexible (linker). La capsid joue un rôle à la fois dans les étapes précoces et tardives du cycle viral (Frankel and Young, 1998; Waheed and Freed, 2012).

Une boucle dans le NTD interagit avec la protéine cellulaire cyclophiline A (CypA) conduisant à l'incorporation de cette dernière dans les particules virales (Franke et al., 1994; Luban et al., 1993; Thali et al., 1994). L'extinction de l'expression de CypA ou l'inhibition de son incorporation dans les virions provoque une diminution de l'infection indiquant que CypA est importante dans les étapes précoces de l'infection (Braaten et al., 1996a; Braaten and Luban, 2001). Il semble que CypA puisse modifier la structure de la capsid et ainsi faciliter l'étape de décapsidation (Grattinger et al., 1999).

Dans le CTD se trouve le domaine MHR (Major Homology Region) constitué de 20 résidus (a.a. 153 à 172) hautement conservés entre les différentes souches du VIH-1. Le CTD est le domaine de dimérisation de la CA qui contribue aux interactions Gag-Gag requises lors de l'assemblage (Lingappa et al., 2014).

Finalement, la CA joue également un rôle dans l'import nucléaire du génome viral. Plusieurs études utilisant un criblage à base d'ARN interférents ont identifiés Nup160, Nup153, et le facteur de transport nucléaire (TNPO3) comme acteurs cellulaires requis pour l'infection par le VIH-1 (Brass et al., 2008; Konig et al., 2008). Le lien entre CA et ces protéines a été souligné par une étude montrant qu'une mutation de CA diminue la sensibilité de l'infection par le VIH-1 à l'extinction de l'expression de ces protéines (Lee et al., 2010).

I.2.3.3.3. La nucléocapsid (NC)

La protéine de la nucléocapsid ou NC est retrouvée dans la cellule et les virions sous deux formes : soit comme domaine fonctionnel de la polyprotéine Gag (NC-Gag), soit sous sa forme mature (NCp7 ; 55 a.a. ; 7kDa). Elle est caractérisée par deux motifs en doigts de zinc hautement conservés reliés par une séquence basique (Roques et al., 1997; Thomas and

Gorelick, 2008). Sa structure ainsi que ses propriétés seront détaillées dans la section I.4 de ce manuscrit.

I.2.3.3.4. La protéine p6

La protéine p6 se situe à l'extrémité C-terminale de la polyprotéine Gag (**Figure 8**). Elle est constituée de 52 a.a. pour un poids moléculaire de 5kDa. Elle présente deux domaines importants, PTAP et LYPX_nL appelés domaines tardifs ou « Late motif ». Ces deux domaines interagissent avec plusieurs protéines cellulaires de la famille ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport) qui sont recrutées au cours de la formation des corps multivésiculaires, de la cytokinèse et du bourgeonnement de virus enveloppés comme le VIH-1. Le motif PTAP interagit avec la protéine TSG101 du complexe ESCRT-I et le motif LYPX_nL interagit avec la protéine Alix qui est un cofacteur des protéines ESCRT (Strack et al., 2003). L'étape de bourgeonnement du virus sera discutée en détail dans la section I.3 de ce manuscrit. Par ailleurs, la protéine p6 interagit avec la région N-terminale de la protéine Vpr et permet son incorporation dans les particules virales (Bachand et al., 1999).

I.2.3.3.5. Les peptides SP1 et SP2

Les deux peptides SP1 et SP2 (SP pour Spacer Peptide) séparent la capsid de la nucléocapside (SP1, 14 a.a.) et la nucléocapside de p6 (SP2, 16 a.a.). Bien que les fonctions précises de ces domaines ne soient pas bien identifiées, leur présence dans Pr55^{Gag} semble réguler le taux de clivage au niveau des sites de reconnaissance de la PR et donc influencer la maturation de la polyprotéine et la morphogénèse virale qui sont nécessaires pour produire des virus infectieux (Gottlinger, 2001; Klein et al., 2007). SP1 contribue également avec la CA à la multimérisation de Gag. SP2 ne semble pas avoir de rôle essentiel dans l'infection virale autre que celui de réguler le clivage par la PR (de Marco et al., 2012).

I.2.3.4. Les protéines enzymatiques

I.2.3.4.1. La protéase (PR)

La protéase (PR) qui appartient à la famille des aspartyl protéases, est composée de deux sous unités identiques de 99 a.a.. Son site actif contenant la triade catalytique Asp25-Thr26-Gly27 est situé à l'interface des deux sous unités (Navia et al., 1989). La protéase est générée à partir

du précurseur Pr160^{Gag-Pol} par un mécanisme autocatalytique, elle poursuit alors le clivage des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} afin de libérer respectivement les protéines de structure (MA, CA, NC, SP1, SP2 et p6) et enzymatiques (PR, RT et IN). Ce clivage a principalement lieu au sein de la particule virale, après bourgeonnement du virus, même s'il peut également se dérouler concomitamment au bourgeonnement (Hill et al., 2005; Kohl et al., 1988). Cette étape entraîne un réarrangement conformationnel des particules virales qui permet aux particules virales d'acquérir leur pouvoir infectieux. Des facteurs altérant l'activité de la protéase peuvent conduire à la formation de virus immatures et non infectieux (Frankel and Young, 1998; Kaplan et al., 1994) ce qui a permis le développement de plusieurs anti-viraux ciblant cette protéine essentielle à l'infection virale (Broder, 2010).

I.2.3.4.2. La transcriptase inverse (RT)

La transcriptase inverse ou RT est un hétérodimère composé des sous-unités p66 (560 a.a.) et p51 (450 a.a.). L'assemblage d'une RT active se fait en deux étapes. Dans un premier temps, la sous unité p66 qui est directement issue du clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol}, s'homodimérise pour former le peptide p66/p66. Dans un second temps, l'une des deux sous-unités p66 subit un clivage interne pour former l'hétérodimère RTp66/p51 (Gopalakrishnan et al., 1992). La RT est une enzyme multifonctionnelle possédant une activité ADN polymérase ARN- et ADN-dépendante ainsi qu'une activité endonucléase (RNase H) polymérase dépendante ou indépendante, qui dégrade spécifiquement l'ARN dans les duplex ARN/ADN formés au cours de la transcription inverse. Dans l'hétérodimère, seule la sous-unité p66 est catalytiquement active, la sous unité p51 jouant un rôle structural (Le Grice et al., 1991; Wang et al., 1994). La RT présente un taux d'erreur élevé et ne possède pas une activité correctrice ce qui est, en partie, à l'origine de la diversité génétique du VIH-1 (Anastassopoulou and Kostrikis, 2006).

La transcription inverse est présentée en détail dans la section I.3 de ce manuscrit. La RT a été la première cible pour la conception de médicaments anti-VIH. Deux grandes classes d'inhibiteurs de la RT sont utilisés en clinique : les inhibiteurs nucléosidiques (INTI) comme l'AZT et les inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI) comme la névirapine (Frankel and Young, 1998).

I.2.3.4.3. L'intégrase (IN)

L'intégrase est une protéine de 32kDa (288 a.a.) issue du clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol}. Comme toutes les autres enzymes virales, elle est active en tant qu'oligomère, probablement sous forme de tétramère (Rice et al., 1996). L'IN est composée de trois domaines structuraux et fonctionnels: un domaine N-terminal qui lie le zinc (motif HHCC) nécessaire à l'oligomérisation, un domaine central catalytique et un domaine C-terminal impliqué dans la liaison à l'ADN (Chiu and Davies, 2004). L'IN est essentielle pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. Son mode d'action est détaillé dans la section I.3 de ce manuscrit.

En plus de l'intégration, l'IN possède d'autres fonctions. Elle est impliquée dans les premières étapes de la transcription inverse (Wu et al., 1999; Zhu et al., 2004) en stimulant à la fois les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription inverse (Dobard et al., 2007). Son effet sur la transcription inverse pourrait également être médié par son interaction avec des protéines cellulaires telles que SIP1/Gemin 2 (Nishitsuji et al., 2009) et la chaîne légère de la dynéine cellulaire (Jayappa et al., 2015). L'interaction de l'IN avec SIP1/Gemin 2 semble stabiliser la forme multimérique de l'IN et favoriser son assemblage avec la RT sur l'ARN viral permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de la transcription inverse. Concernant l'interaction avec la chaîne légère de la dynéine cellulaire, il semble que cette interaction joue un rôle dans la régulation de la décapsidation et dans l'efficacité de la transcription inverse. Finalement, l'IN jouerait aussi un rôle dans l'import nucléaire du PIC en interagissant avec la protéine importin-3 (Ao et al., 2010). Comme les autres enzymes, l'IN est également une cible pour la conception de médicaments anti-VIH, plusieurs molécules ayant été approuvées par la FDA, comme par exemple le raltégravir.

I.2.3.5. Les protéines régulatrices

I.2.3.5.1. La protéine Tat (Transactivator of Transcription)

La protéine Tat est codée par deux exons, l'exon 1 code pour la région N-terminale (a.a. 1 à 72) et l'exon 2 code pour la région C-terminale (a.a. 72 à 101). Au cours de la transcription du génome viral, Tat se lie à la séquence TAR de l'ARN nouvellement synthétisé et active fortement l'expression du génome viral en interagissant avec un facteur de transcription cellulaire appelée pTEFb (Isel and Karn, 1999).

Plusieurs autres fonctions ont été associées à Tat. Elle a notamment été décrite pour, d'une part, augmenter l'expression d'un certain nombre de cytokines, le co-récepteur CCR5 du VIH-1, et le récepteur (CD25) de l'interleukine-2 (IL-2) dans les cellules infectées par le VIH-1 et d'autre part pour diminuer l'expression de plusieurs gènes tels que le CMHI induisant une suppression immunitaire et l'apoptose (Romani et al., 2010).

Même si Tat n'est pas incorporée dans les virions, elle a une influence sur plusieurs étapes du cycle viral. Tat présente une activité chaperonne, ce qui peut expliquer sa capacité à stimuler la transcription inverse aussi efficacement que NCp7, et précisément dans les deux sauts de brin (Boudier et al., 2014; Boudier et al., 2010; Chiu et al., 2002; Godet et al., 2012; Jablonski et al., 2010; Lin et al., 2015). L'implication de Tat dans les étapes tardives de la réplication virale a également été mentionnée, comme par exemple dans l'épissage de l'ARN viral en interagissant avec la protéine cellulaire mce1 (mRNA capping enzymes). En outre, Tat est également libérée des cellules infectées dans le milieu extracellulaire et est capable d'entrer dans les cellules non infectées, induisant leur apoptose, ou dans des cellules latentes pour activer la transcription du génome viral (Debaisieux et al., 2012; Frankel and Pabo, 1988). A noter que la capacité de Tat à traverser les membranes cellulaires a été à l'origine du développement du premier CPP (cell penetrating peptide) qui correspond au domaine basique de la protéine Tat (Vives et al., 1997). Les CPPs permettent de transporter efficacement diverses molécules biologiquement actives à l'intérieur des cellules vivantes et représentent des vecteurs biologiques prometteurs en clinique et en biotechnologie.

I.2.3.5.2. La protéine Rev (Regulatory of Viral Expression)

La protéine Rev, composée de 116 a.a., est un trans-activateur post-transcriptionnel portant un signal d'export nucléaire (NES) (Fischer et al., 1994) et un signal de localisation nucléaire (NLS) (Meyer and Malim, 1994). En se liant à leur séquence RRE, elle garantit l'export cytoplasmique des ARNs viraux non- ou mono-épissés ($\approx 9\text{kb}$ et $\approx 4\text{kb}$ codant pour Gag, Pol et Env) et permet ainsi la production des protéines de structure et enzymatique conduisant à la formation de virions infectieux. En absence de Rev, ces ARNs resteront, comme les ARNs cellulaires non totalement épissés, dans le noyau et seront multi-épissés permettant l'expression des protéines Tat, Nef et Rev (Fischer et al., 1994; Hope, 1999).

I.2.3.6. Les protéines auxiliaires

I.2.3.6.1. La protéine Nef (Negative Regulatory Factor)

La protéine Nef, composée de 206 a.a. (27kDa), est l'une des premières protéines virales exprimées après l'infection (Klotman et al., 1991). Nef est une protéine myristoylée, au niveau de son extrémité N-terminale, qui s'ancree dans la face cytoplasmique de la membrane plasmique (Niederman et al., 1993). Son implication dans la pathogénicité du virus a été démontrée par le fait qu'une délétion ou mutation au niveau du gène *nef* réduisent considérablement l'infection chez l'homme ou les macaques rhésus infectés respectivement par VIH-1 ou SIV (Kestler et al., 1991; Kondo et al., 2005).

Différents rôles lui ont été attribués : i) Nef diminue le nombre de récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées soit en redirigeant certains CD4 à partir du réseau trans-Golgien vers le compartiment endosomal, soit par un mécanisme d'endocytose des récepteurs à la surface plasmique suivi d'une dégradation par la voie endo-lysosomale (Das and Jameel, 2005; Piguet et al., 1998); ii) Nef régule négativement les récepteurs du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I diminuant alors la reconnaissance et la lyse des cellules infectées par le système immunitaire (Schwartz et al., 1996; Yang et al., 2002); iii) dans les lymphocytes T, Nef stimule la diminution des récepteurs membranaires (TCR-CD3) qui sont un élément important de la synapse immunologique formée entre les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les lymphocytes T reconnaissant les antigènes, ce qui altère l'activation des lymphocytes T et favorise la réplication du VIH-1 (Fackler et al., 2007; Malim and Emerman, 2008; Suspene et al., 2004).

I.2.3.6.2. La protéine Vif (Virion Infectivity Factor)

La protéine Vif, composée de 192 a.a. (23kDa), est exprimée au cours de la phase tardive du cycle viral. Elle interagit avec l'ARN viral (pour lequel elle a une activité chaperonne) (Bernacchi et al., 2007; Henriot et al., 2005; Henriot et al., 2007; Kahn and Walker, 1998) et est encapsidée dans les virions.

Elle a été appelée « facteur d'infectivité virale » puisque des virus dépourvus du gène *vif* (VIH-1 Δ vif) sont incapables de se répliquer dans les cellules non permissives comme les monocytes, les macrophages et les lymphocytes primaires alors qu'ils se répliquent normalement dans d'autres lignées cellulaires dites permissives (HeLa, 293T, Cos7, Jurkat

...). Cette différence est due à l'expression de deux facteurs de restriction cellulaire de la réplication du VIH-1 APOBEC3G (A3G) et APOBEC3F (A3F) par les cellules non permissives. APOBEC3G/F (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3) sont des cytosines désaminases cellulaires qui catalysent la désamination de la cytidine (C) en uridine (U) sur le premier brin synthétisé (de polarité négative) lors de la transcription inverse de l'ARN viral (Suspene et al., 2004). Ceci aboutit, lors de la copie du deuxième brin d'ADN à des mutations de Guanidine (G) vers Adénine (A) dans le brin positif du VIH-1. Le taux élevé de mutations de (G) vers (A), définit l'« hypermutation » du génome. Le virus est alors, dans la grande majorité des cas, non viable par apparition de codon faux sens ou de codons stop.

La plupart de ces actions nécessitent l'incorporation de A3G et A3F dans les virions. Vif contrecarre l'effet de APOBEC3G/F par différents mécanismes: (i) inhibition de leur encapsidation dans les virions, (ii) induction de la dégradation d'A3G/3F par le protéasome (iii) régulation négative de la traduction de l'ARNm d'A3G (Li et al., 2004; Mariani et al., 2003).

I.2.3.6.3. La protéine Vpr (Viral Protein R)

La protéine Vpr, composée de 96 a.a. (14kDa), est encapsidée dans les virions grâce à son interaction avec le domaine p6 de Gag. De nombreuses fonctions ont été attribuées à cette protéine, y compris dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction d'apoptose, l'import nucléaire du PIC et la fidélité de la transcription inverse (Guenzel et al., 2014; Jenkins et al., 1998). Il est important de souligner qu'alors que le génome du VIH-1 code uniquement Vpr, le génome du VIH-2 code deux protéines Vpr et Vpx. Cette dernière étant apparue par duplication du gène *vpr* (Tristem et al., 1992). Les deux protéines Vpr et Vpx sont homologues présentant de fortes similitudes fonctionnelles et structurales, la protéine Vpr étant de loin la protéine la plus étudiée.

1- Vpr module le taux de mutation dans le génome viral. En effet, Vpr interagit avec la forme nucléaire de la protéine cellulaire UNG2 (Uracil DNA Glycosylase), enzyme de réparation de l'ADN dont la fonction est d'assurer l'élimination des bases uraciles présentes dans l'ADN, incorporées par erreur ou (dans le cas du génome de VIH) résultant de la désamination de cytosines par les enzymes de restriction virale de la famille APOBEC3 (Chen et al., 2004; Guenzel et al., 2014). Ces mutations qui peuvent rendre le génome

« non-fonctionnel » si elles sont trop fréquentes sont également responsables de l'émergence de souches VIH-1 résistantes aux antirétroviraux (Mansky, 1996).

- 2- Vpr ne possède pas une séquence classique de localisation nucléaire, mais elle présente une forte affinité pour l'enveloppe nucléaire (Le Rouzic et al., 2002) de par son interaction avec la nucléopore hCG1, élément du complexe formant le pore nucléaire (NPC). L'ancrage de Vpr au NPC permettrait le recrutement du PIC au niveau de l'enveloppe nucléaire afin de permettre son import nucléaire.
- 3- Vpr inhibe la prolifération des cellules infectées en induisant un blocage du cycle cellulaire en phase G2 (Stivahtis et al., 1997). L'arrêt en G2 placerait le virus dans un contexte traductionnel favorable, lui permettant d'optimiser son expression au dépend de la cellule avant la mort de cette dernière (Jowett et al., 1995).
- 4- Vpr induit l'apoptose de la cellule au cours de l'infection VIH-1 par perméabilisation de la membrane mitochondriale et induction de la libération de protéines pro-apoptotiques. (Guenzel et al., 2014).

I.2.3.6.4. La protéine Vpu (Viral Protein U)

La protéine Vpu, composée de 81 a.a. (16kDa) n'est retrouvée que pour le VIH-1 (Maldarelli et al., 1993). Les deux fonctions connues de Vpu dans le cycle viral sont les suivantes: (i) Vpu joue un rôle dans la dégradation des récepteurs CD4 neosynthétisés. En interagissant avec les récepteurs CD4 neosynthétisés dans le reticulum endoplasmique (RE), elle facilite leur dégradation via le protéasome conduisant à une réduction spectaculaire de l'expression de CD4 dans les cellules infectées (Lindwasser et al., 2007). La dégradation de CD4 induit alors la libération de la protéine Env du RE et le transport des gp120 et gp41 à la surface de la membrane plasmique (Dube et al., 2010; Tiganos et al., 1997). (ii) Vpu stimule la libération des particules virales à la surface des cellules infectées. Cette fonction de Vpu a été observée dans certains types de cellules, notamment les cellules exprimant de manière importante « la téthérine ». Cette dernière est un facteur de restriction cellulaire qui interfère avec la libération des particules virales. Vpu contrecarre l'effet de la téthérine en induisant sa dégradation par la voie endolysosomale ou en empêchant sa localisation au niveau des régions membranaires riches en cholestérol et protéines, lieu de bourgeonnement préférentiel du VIH-1 (Neil et al., 2008).

I.3. Le cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle viral peut être décomposé en deux phases :

Une phase précoce, comprenant dans l'ordre, les étapes de reconnaissance et fixation du virus sur les récepteurs membranaires de la cellule hôte ; de fusion et entrée du virus ; de transcription inverse de l'ARN viral en ADN génomique et pour finir de son intégration au génome de la cellule cible.

La seconde phase est qualifiée de tardive et comprend la transcription des ARN messagers et génomiques viraux, leur export du noyau, la traduction des protéines cellulaires ainsi que l'assemblage et le bourgeonnement de nouveaux virions (**Figure 10**). Elle se termine par la maturation extracellulaire des virions lors du clivage des polyprotéines au sein de la particule.

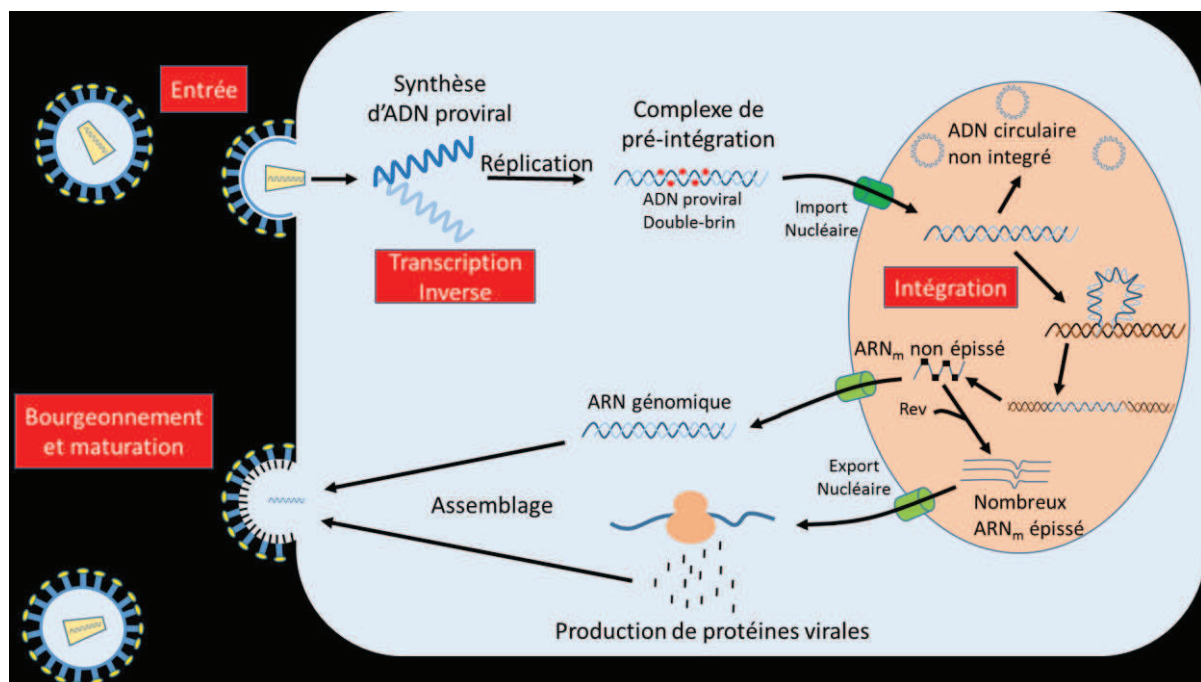


Figure 10 : Le cycle viral du VIH-1. Le cycle de réplication du VIH-1 se déroule en 2 phases : la phase précoce, correspondant à l'interaction entre les glycoprotéines virales d'enveloppe et la membrane plasmique de la cellule hôte, la fusion, la transcription inverse et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée. La phase tardive comprend la transcription et la traduction de l'ADN en protéines virales, qui seront ensuite assemblées en nouvelles particules virales, avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire, où elles pourront être maturées.

I.3.1. Entrée du virus

L'entrée du VIH-1 dans la cellule nécessite la fusion des membranes virale et cellulaire (**Figure 11**). Le processus d'entrée est précédé d'une phase de liaison ou fixation au cours de laquelle le virus est adsorbé sur la surface des cellules via des interactions spécifiques ou non spécifiques avec différents types de molécules de surface cellulaire telles que les lectines DC-SIGN ou les protéoglycanes de type sulfate d'héparine (Geijtenbeek et al., 2000; Mondor et al., 1998). Après la fixation, la protéine virale gp120 se lie spécifiquement aux récepteurs CD4 des cellules cibles telles que les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules de Langerhans et les cellules microgliales (Clavel et al., 1986; Dalgleish et al., 1984; Maddon et al., 1986; Nisole and Saib, 2004) (**Figure 11**). Cette interaction induit un changement conformationnel de la gp120 qui permet sa liaison aux corécepteurs, les récepteurs aux chimiokines : CXCR4 ou CCR5 (Berger et al., 1999; Deng et al., 1996; Feng et al., 1996; Kwong et al., 1998).

Suite à cette liaison, le changement de conformation de gp41 conduit à l'exposition d'un peptide de fusion qui s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible et déclenche la fusion des membranes virale et cellulaire (Barbouche et al., 2003; Chan et al., 1997; Wilen et al., 2012). L'utilisation préférentielle de l'un des deux co-récepteurs détermine le tropisme du virus. En effet, les souches VIH-1 qui utilisent le co-récepteur CCR5 sont désignées comme souches R5, elles infectent les macrophages et les lymphocytes primaires. Alors que les virus X4 utilisent le co-récepteur CXCR4 et peuvent infecter les lignées lymphocytaires T ainsi que les lymphocytes primaires. R5X4 sont des «souches double tropisme » capables d'utiliser indifféremment CCR5 et CXCR4 (Berger et al., 1999; Clapham and McKnight, 2001). En parallèle de cette entrée CD4-dépendante, le VIH-1 peut entrer dans la cellule par endocytose. Cependant, le fait que cette entrée aboutisse à une infection productive est encore un sujet de controverse (Daecke et al., 2005; Permanyer et al., 2010). Il est toutefois possible que l'endocytose soit impliquée dans la transmission directe de cellule à cellule, notamment par la formation de synapses virologiques qui correspondent à des contacts étroits entre cellules, le plus souvent induits par l'infection qui, par analogie avec les synapses immunologiques, sont dépendantes du cytosquelette et engagent des molécules virales et cellulaires de surface (Jolly and Sattentau, 2004; Mothes et al., 2010).

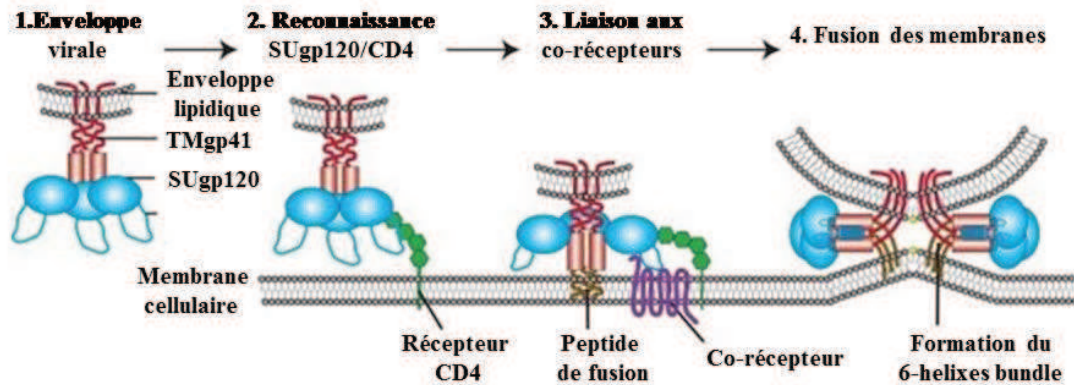


Figure 11: Représentation schématique de l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible. Les glycoprotéines virales externes constituées des sous-unités gp120 et gp41 (1) se fixent à la cellule hôte par reconnaissance spécifique entre le récepteur CD4 et la protéine gp120 (2) induisant un changement de conformation de la protéine virale permettant la liaison de gp120 au co-récepteur et l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane plasmique (3) ce qui déclenche la formation d'une structure à six hélices (6 helix-bundle) permettant le rapprochement et la fusion des deux membranes virales et cellulaires (Wilén et al., 2012).

I.3.2. La décapsidation

Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par leur capacité à s'intégrer et se répliquer dans les cellules quiescentes (qui ne se divisent pas) comme les macrophages. La réplication dans les cellules quiescentes nécessite un import nucléaire actif du génome viral, via les pores nucléaires, ce qui impose au préalable une étape de décapsidation. En effet le diamètre de la capsid virale (~ 60nm) est supérieur à celui du pore nucléaire (~ 30nm).

Par définition, la décapsidation est la perte de la capsid conique qui entoure le génome viral. Le lieu et le moment de cet étape sont un sujet de controverse (pour revue voir Ambrose and Aiken, 2014; Arhel, 2010). Un premier modèle suggère que la décapsidation a lieu à proximité de la membrane plasmique directement après l'entrée du virus. Il est basé sur l'absence d'une quantité significative de CA au sein des complexes intracellulaires du VIH-1 observés aussitôt après l'infection (Iordanskiy et al., 2006; Karageorgos et al., 1993). Toutefois, ce modèle est fondé sur des études biochimiques basées sur la purification des complexes cytoplasmiques et nucléaires du VIH-1 à partir des cellules. Une perte en CA peut alors avoir eu lieu pendant les procédures de purification.

Un deuxième modèle propose que la décapsidation se déroule progressivement au cours de la transcription inverse et du transport vers la membrane nucléaire (Arfi et al., 2009; Forshey et al., 2002; Hulme et al., 2011). Un troisième modèle suggère que la décapsidation se produit à la membrane nucléaire après l'achèvement de la transcription inverse. Ce modèle est supporté

par le fait que l'inhibition de la transcription inverse par la névirapine conduise à une accumulation de la capsidie au niveau de la membrane nucléaire (Arhel et al., 2007).

Les premiers complexes d'acides nucléiques viraux trouvés à l'intérieur de la cellule après l'entrée sont appelés RTC (Reverse Transcription Complex) car ils sont compétents pour réaliser une transcription inverse. Une fois que l'ARN simple brin est transcrit en ADN double brin, ce complexe est nommé PIC (Pre-Integration Complex).

I.3.3. La Transcription inverse

La transcription inverse est un processus complexe et ordonné qui permet la transformation de l'ARN viral simple brin en ADN proviral double brin. Le RTC est composé de l'ARNg viral recouvert de NCp7, de la RT, de MA, de CA, Vpr et IN (Fassati and Goff, 2001). Dans cette étape du cycle viral, les fonctions chaperonnes de la NCp7 sont mises à profit, notamment lors de l'hybridation de l'amorce répliquative du VIH-1, l'ARNt^{Lys3} et dans les deux sauts de brins.

La transcription inverse peut être divisée en plusieurs étapes successives :

La synthèse du brin négatif d'ADN strong-stop

La transcription inverse est initiée par l'hybridation de l'amorce ARNt^{Lys3}, encapsidée dans les virions, à la séquence PBS située à l'extrémité 5' du génome viral (**Figure 12, étape 1**). La RT reconnaît le complexe ARNt/ARNg et initie la synthèse du brin d'ADN(-) strong-stop ((-)ssADN) en procédant à l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce jusqu'à l'extrémité 5' du génome contenant les séquences R et U5 (**Figure 12, étape 2**). Le brin (-)ssADN contient alors les séquences R et U5 et l'ARNt^{Lys3} reste attaché à l'extrémité 5' de ce brin. La synthèse du brin (-) ssADN est associée à la dégradation du brin d'ARN retrotranscrit par l'activité RNase H de la RT.

Le premier saut de brin

Afin de poursuivre la synthèse du brin négatif, le brin (-)ssADN est transféré à l'extrémité 3' du génome où il s'hybride à la séquence R du côté 3' du génome viral (**Figure 12, étape 3**).

Synthèse complète du brin négatif d'ADN (ADN(-))

Après le premier saut de brin, la synthèse du brin ADN(-) se poursuit et s'arrête à proximité de la séquence PBS en 5'. En parallèle, l'activité RNase H de la RT dégrade l'ARN retrotranscrit du complexe ARN/ADN. Cependant, deux séquences d'ARN riches en purine sont résistantes à la dégradation par la RNase H. Il s'agit des séquences PPT et PPTc (**Figure 12, étape 4**).

Initiation de la synthèse du brin positif d'ADN (ADN(+))

Les deux séquences PPT et PPTc servent d'amorces pour la synthèse du brin ADN(+) (**Figure 12, étape 5 et 6**). La synthèse progresse vers l'extrémité 5' du brin négatif en copiant U3, R et U5 et se termine après la retranscription d'une partie de l'ARNt qui sera ensuite dégradé par l'activité RNase H de la RT (**Figure 12, étape 7**).

Second saut de brin et achèvement de l'élongation

L'hybridation des séquences PBS(+) et PBS(-) constitue le second saut de brin. Elle conduit à la circularisation de l'ADN (**Figure 12, étape 7**), puis la synthèse d'ADN continue pour aboutir finalement à la formation d'un ADN viral linéaire présentant à ses extrémités les séquences LTR (U3-R-U5) et possédant en plus un fragment simple brin dans sa région centrale qui correspond à l'ADN Flap (**Figure 12, étape 8**) (Arhel, 2010; Freed, 2001).

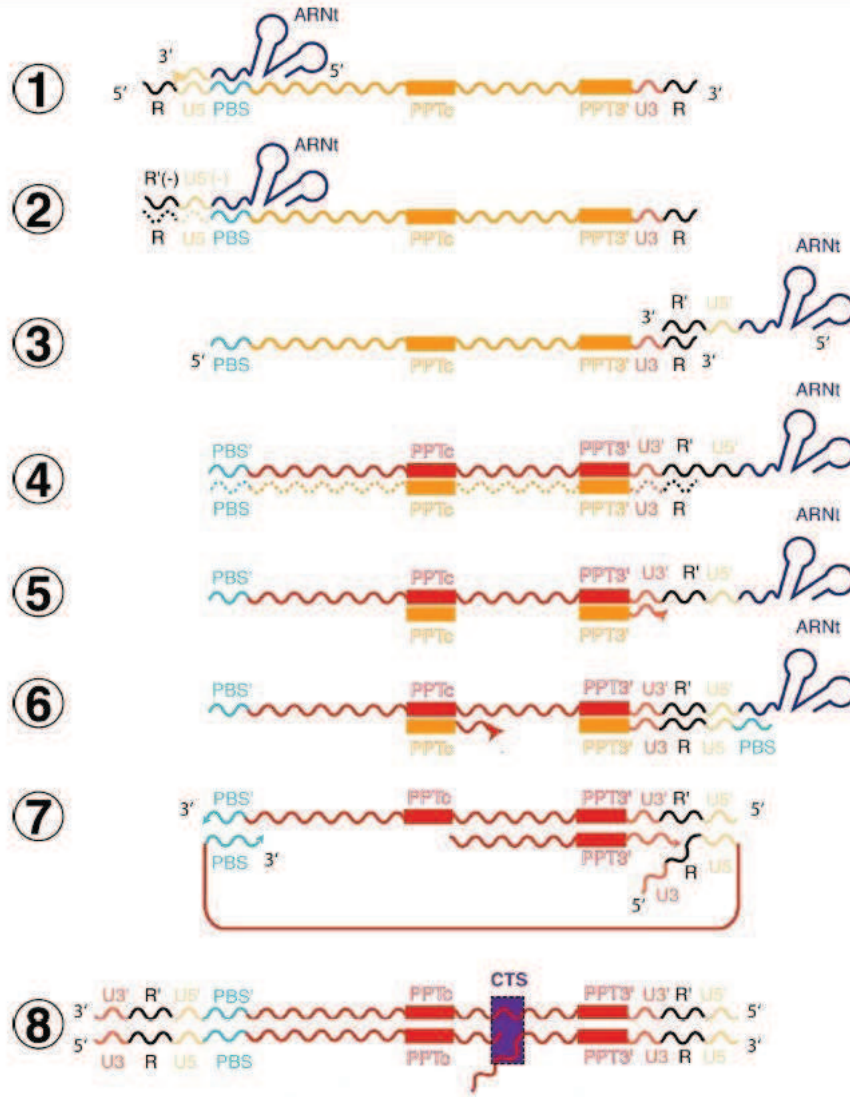


Figure 12: Représentation schématique de la transcription inverse. La matrice ARN est représentée en orange, l'ARNt^{Lys3} en bleu foncé, les brins d'ADN néosynthétisés en rouge, la séquence PBS en bleu clair et la séquence R en noir. Les différentes étapes (1 à 8) sont décrites dans le texte (Goldschmidt V, 2010).

I.3.4. Import nucléaire et intégration

Après l'achèvement de la transcription inverse, l'ADN proviral est transporté, au sein du PIC, vers le noyau. La composition du PIC est toujours fortement débattue. Plusieurs études valident la présence de Vpr et MA en plus de l'ADN viral et de l'IN (Iordanskiy et al., 2006; Miller et al., 1997). A noter que la présence de la protéine de nucléocapside NCp7 au sein du PIC est un sujet de controverse (Farnet and Haseltine, 1991; Gallay et al., 1995; Karageorgos et al., 1993; Thomas and Gorelick, 2008). De nombreux facteurs cellulaires ont également été retrouvés dans des études de caractérisation du PIC dont les protéines de liaison à l'ADN

BAF (Barrier to Autointegration Factor) (Chen and Engelman, 1998; Karn, 1999), HMG1(Y) (High Mobility Group) (Farnet and Bushman, 1997), KU de la voie « jonction d'extrémités non homologues » de réparation de l'ADN (Li et al., 2001) et LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor -75kDa) (Llano et al., 2004) toutes impliquées dans l'intégration des rétrovirus.

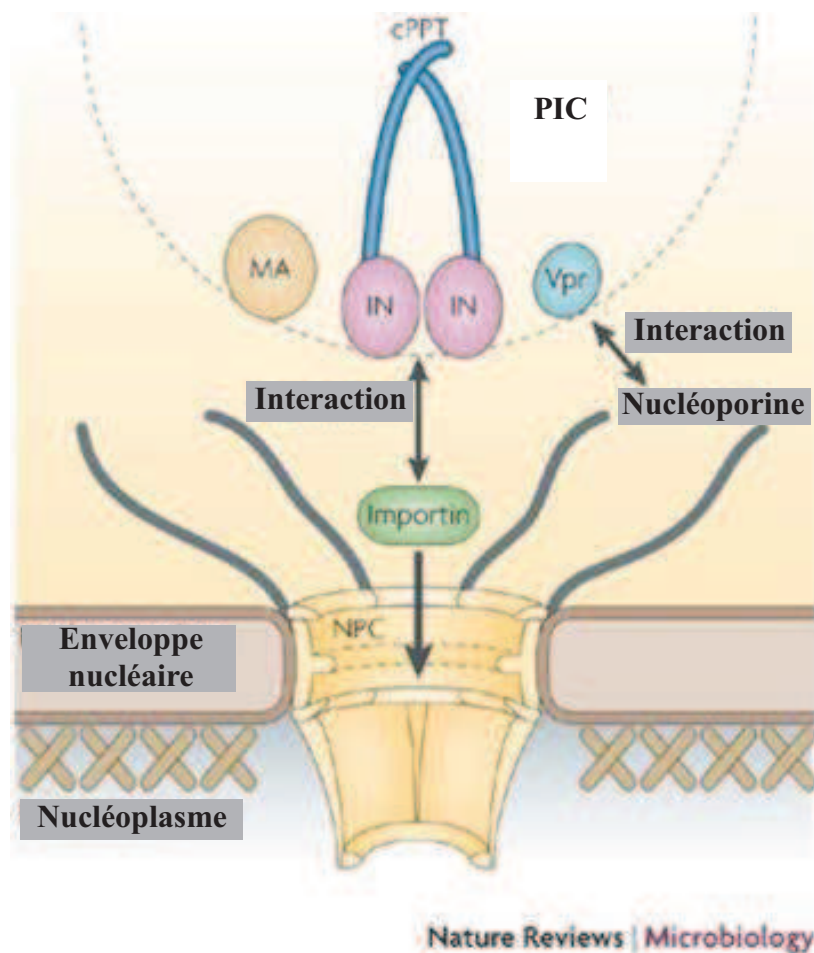


Figure 13 : Les facteurs viraux MA, Vpr, IN, et PPTc ont été décrits pour faciliter l'import nucléaire du PIC via les pores nucléaires. Bien que MA et Vpr aient été décrites pour interagir avec les importines et les nucléoporines, l'implication de ces interactions dans l'import nucléaire du PIC est controversée. Adaptée de Suzuki and Craigie, 2007.

La taille du PIC, supérieure à 60 kDa, exclue la possibilité d'un import nucléaire par diffusion passive et implique un transport actif à travers la membrane nucléaire (**Figure 13**). Plusieurs des protéines du PIC possèdent des NLS (MA, IN et Vpr) contribuant ainsi aux propriétés

karyophiliques du PIC (Sherman and Greene, 2002; Suzuki and Craigie, 2007). Ces propriétés sont étroitement liées à la machinerie d'import nucléaire cellulaire, et en particulier aux protéines importine α , Transportin 3, Nup153 et Nup358 (pour revue voir Fassati, 2012; Matreyek and Engelman, 2013). Cependant, la participation de ces protéines virales dans l'import nucléaire du PIC reste controversée (Fassati, 2006; Piller et al., 2003; Riviere et al., 2010). Un autre élément viral, l'ADN Flap serait impliqué dans l'import nucléaire du PIC (Ao et al., 2004; Zennou et al., 2000). Des mutations, au niveau du PPTc conduisent à un ADN génomique viral linéaire dépourvu de l'ADN Flap central, entraînant une réduction considérable de la réplication virale. Alors que l'ADN viral sauvage est en grande partie transporté dans le noyau, les génomes dépourvus d'ADN Flap s'accumulent à la périphérie de l'enveloppe nucléaire indiquant un défaut d'import nucléaire (Arhel et al., 2007). Des données récentes ont également souligné l'importance de la capsidie dans l'import nucléaire du PIC. En effet, l'association de molécules de CA au PIC (Arhel et al., 2007; Dismuke and Aiken, 2006) et l'identification de partenaires protéiques cellulaires de CA dans la voie d'import/export nucléaire suggèrent l'implication de la capsidie dans cette étape du cycle viral (Matreyek and Engelman, 2013). Le fait que cette question reste à ce jour non résolue est probablement lié à la grande redondance des signaux d'import nucléaires trouvés sur les différents composants du PIC.

Après l'import nucléaire, l'ADN proviral est intégré dans le génome de la cellule hôte (Craigie and Bushman, 2012). L'intégration peut être divisée en trois étapes (**Figure 14**). Dans un premier temps, l'IN reconnaît spécifiquement les deux LTR aux extrémités de l'ADN viral (Kukolj and Skalka, 1995) et clive les deux derniers nucléotides en 3' de chacun des deux brins d'ADN libérant un dinucléotide CA (fortement conservé) ainsi qu'une extrémité 3'OH (3' processing). Par la suite, l'IN clive l'ADN génomique de la cellule cible et catalyse l'insertion de l'extrémité CA-OH 3' dans le génome cellulaire (transfert de brin). Finalement, les enzymes cellulaires de réparation de l'ADN interviennent pour corriger les discontinuités entre les ADN cellulaire et viral (Engelman et al., 1991; Vink et al., 1991a; Vink et al., 1991b).

L'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte n'est pas aléatoire, elle a préférentiellement lieu au niveau de sites activement transcrits appelés « points chauds » (Lewinski et al., 2006; Schroder et al., 2002). La plupart des cellules infectées contiennent

plus d'un provirus intégré (Jung et al., 2002). Les sites, le nombre et l'efficacité d'intégration semblent influencés par plusieurs protéines cellulaires (Bushman et al., 2005; Suzuki and Craigie, 2007). Ces protéines comprennent le LEDGF / p75 (De Rijck et al., 2010; Marshall et al., 2007), l'HMG-I(Y), protéine architecturale de la chromatine (Farnet and Bushman, 1997) ; la sous-unité SNF5/Ini1 du complexe de remodelage de la chromatine ; le complexe SWI/SN de remodelage du nucléosome (Kalpana et al., 1994) et la protéine BAF (Chen and Engelman, 1998).

Par ailleurs, la protéine virale NCp7 jouerait également un rôle stimulateur de l'intégration, comme cela est décrit dans la section I.4 de ce manuscrit.

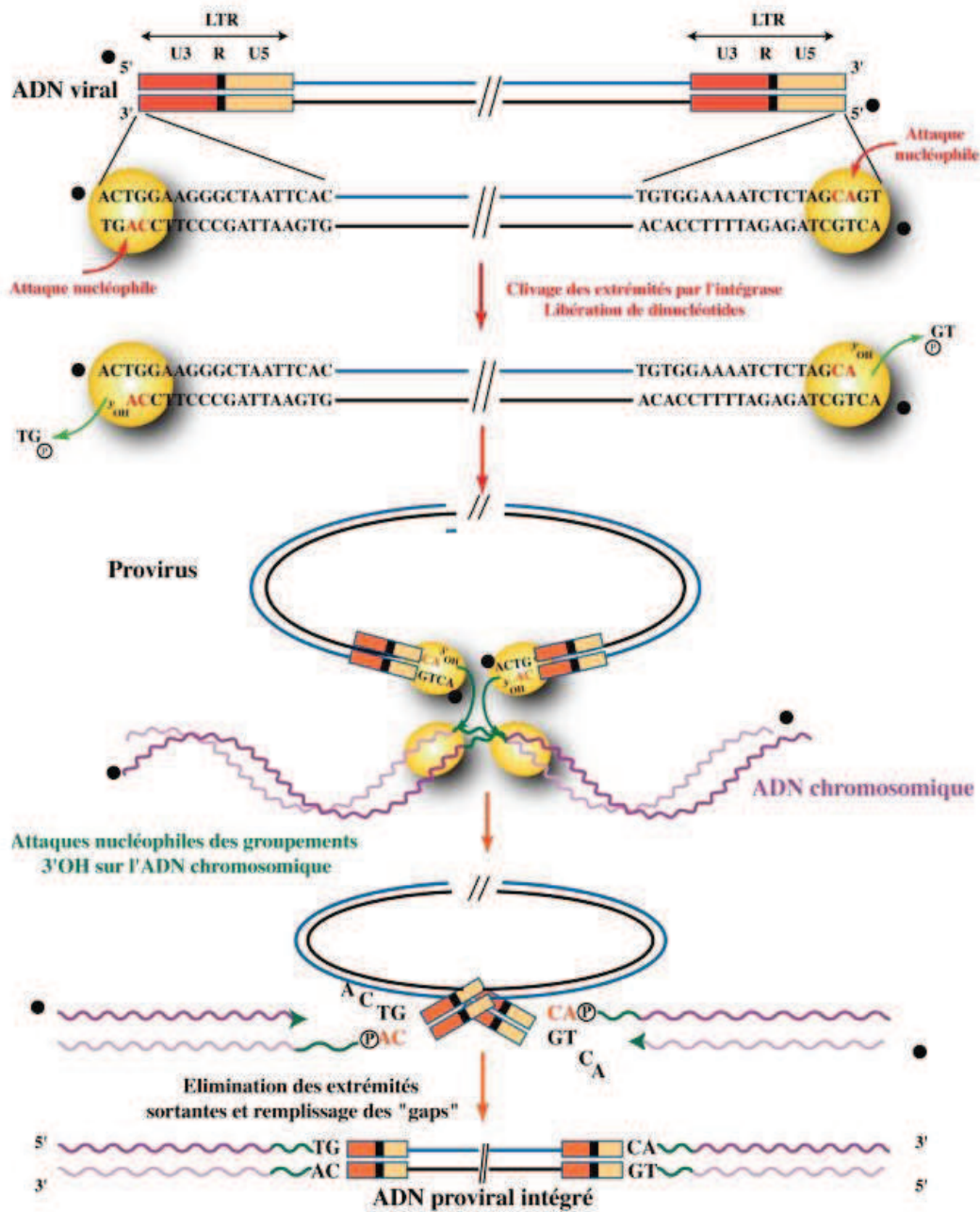


Figure 14: Représentation schématique de l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule cible. Les extrémités de l'ADN viral sont reconnues et clivées par l'intégrase, ce qui permet l'élimination de deux nucléotides (TG) à chacune des extrémités 3' (3' processing). L'ADN cible cellulaire est également clivé par l'intégrase. Par la suite, les extrémités 3'OH de l'ADN viral sont liées aux extrémités 5'phosphate de l'ADN cellulaire (transfert de brin). Finalement, les discontinuités entre l'ADN cellulaire et viral sont corrigées par des enzymes cellulaires.

I.3.5. L'expression du génome viral

Après intégration dans le génome de la cellule hôte, l'ADN proviral, comme l'ADN cellulaire, est retrouvé au sein de nucléosomes (Gatignol, 2007), cet état très structuré et condensé de la

chromatine peut restreindre l'accès aux facteurs cellulaires régulant la transcription et réprimer l'expression de l'ADN proviral intégré résultant en un état de latence virale (Gatignol, 2007; Marcello, 2006).

La protéine Tat du VIH-1 recrute certains facteurs de remodelage ou de modification de la chromatine comme SWI/SNF, CBP (p300/CRE binding protein), PCAF (P300/CBP-associated factor) et la protéine hGCN5. Ces facteurs agissent par acétylation des histones permettant le déroulement des nucléosomes et par conséquent l'accessibilité de protéines cellulaires au promoteur viral (Gatignol, 2007).

La transcription des gènes viraux qui nécessite la machinerie transcriptionnelle de la cellule infectée est en effet régulée par plusieurs protéines cellulaires et virales. La région 5'-LTR contient les éléments promoteurs nécessaires à la transcription du provirus par l'ARN polymérase II cellulaire (ARNpII). Elle possède également des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription, y compris Sp1, NF-kB, AP-1 et NF-AT (Garcia et al., 1992; Leonard et al., 1989; Pereira et al., 2000; Ross et al., 1991). L'ARNpII présente une faible processivité quand son domaine C-terminal (CTD) est hypophosphorylé et associé à la protéine DSIF (DRB-sensitivity inducing factor) qui affecte négativement la transcription en recrutant le facteur répresseur de la transcription NELF (Negative Elongation Factor) (**Figure 15-1**). Ceci résulte en l'accumulation de transcrits courts qui seront ensuite multi-épissés et exportés dans le cytoplasme par la machinerie de transport classique des ARNm et finalement traduit par la machinerie de traduction cellulaire pour donner les protéines virales Tat, Rev et Nef. Lorsque Tat est produite en quantité suffisante, elle se lie à la séquence TAR de l'ARNv en cours de transcription et recrute le complexe P-TEFb (Positive Elongation Factor b) composé de la cycline T1 et CDK9 (Cyclin-Dependant Kinase 9) (**Figure 15-2**) (Dingwall et al., 1990; Dingwall et al., 1989; Zhou et al., 2003). CDK9 phosphoryle l'extrémité C-terminale de l'ARNpII augmentant sa processivité (**Figure 15-3**) ainsi que DSIF et NELF permettant leur séparation de l'ARNpII (**Figure 15-2**) et la stimulation de la transcription. L'acétylation de Tat par P300/CBP et hGCN5 au niveau des lysines K50 et K51 entraîne sa dissociation de la séquence TAR (**Figure 15-4**) (Bres et al., 2002; Kaehlcke et al., 2003).

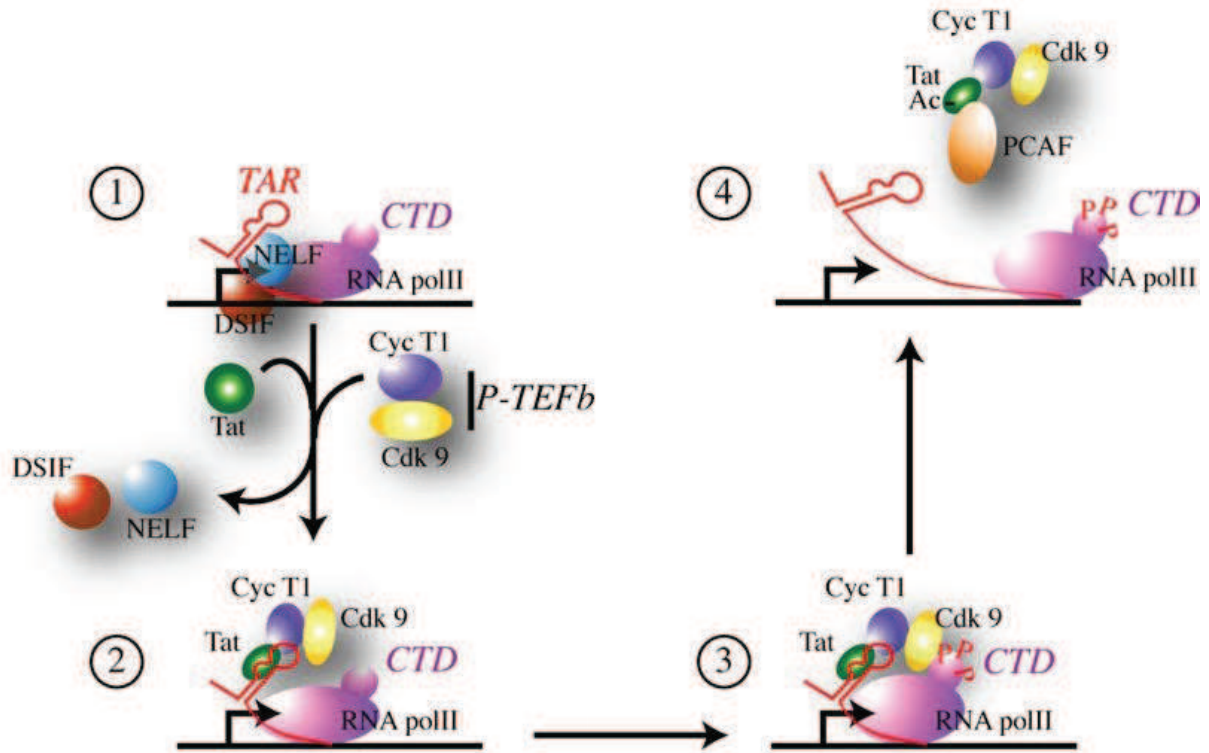


Figure 15 : Activation de la transcription par la protéine virale Tat. (1) L'ARN polymérase II (ARNpII) hypophosphorylée sur son domaine C-terminal (CTD) possède une faible processivité et est associée à des facteurs négatifs d'élongation de la transcription (NELF et DSIF). (2) Tat se fixe spécifiquement au niveau de la séquence TAR de l'ARN viral neosynthétisé et recrute le complexe P-TEFb, composé de la cycline T1 et d'une kinase CDK9. (3) CDK9 hyperphosphoryle l'ARNpII au niveau de son CTD ce qui augmente sa processivité. (4) L'acétylation de Tat et son interaction avec PCAF (p300/CREB binding protein-associated factor) entraîne sa dissociation de la séquence TAR et stimule l'élongation de la transcription (Strebel, 2003).

I.3.6. Epissage, export nucléaire et traduction des ARNm viraux

A partir de l'ARN viral pleine-longueur (9.2kb), le VIH-1 est capable de générer quarante ARNm viraux par un mécanisme d'épissage alternatif (Schwartz et al., 1990; Stoltzfus and Madsen, 2006; Tazi et al., 2010). Ceci est important pour assurer la production de l'ensemble des ARNm codant les différentes protéines virales. La plupart des souches de VIH-1 utilisent quatre sites différents d'épissage 5' ou site donneur et huit sites d'épissage 3' ou site accepteur pour générer des ARNs appartenant à une de ces trois classes (Karn and Stoltzfus, 2012; Purcell and Martin, 1993; Schwartz et al., 1990).

- L'ARNm non-épisé codant pour Gag et Gag-Pol et qui peut également être encapsidé comme génome viral.

- Les ARN mono-épissés (~ 4kb) codant pour les protéines Env, Vif, Vpr et Vpu.
- Les ARN multi-épissés ou totalement épissés (~ 2kb) codant pour les protéines Tat, Rev et Nef

L'épissage est contrôlé par des facteurs cellulaires qui se lient à de courtes séquences flanquant les sites d'épissage du VIH-1: les activateurs d'épissage exoniques (ESE pour Exonic Splicing Enhancers) et les inhibiteurs d'épissage exonique/introniques (ESS/ISS) (Nekhai and Jeang, 2006; Stoltzfus and Madsen, 2006).

Dans la cellule infectée, les ARNm multi-épissés peuvent être exportés du noyau vers le cytoplasme en utilisant les mêmes voies que les ARNm cellulaires, contrairement aux ARNm non- ou mono-épissés qui nécessitent l'implication de la protéine virale Rev (Freed, 2001; Wu and Marsh, 2003). La protéine Rev reconnaît la séquence RRE sur les ARNm non- et mono-épissés (Malim et al., 1989; Mann et al., 1994) et interagit par l'intermédiaire de son signal NES avec le facteur d'export cellulaire CRM1 (Chromosome Maintenance Region 1 ou exportine 1) en présence du facteur d'export nucléaire Ran lié à la guanosine triphosphate (RanGTP)(Fornerod et al., 1997). Le complexe pourra alors être exporté du noyau via les pores nucléaires (**Figure 16**). Une fois dans le cytoplasme, l'hydrolyse du GTP lié à Ran en GDP déstabilise le complexe, Rev libère l'ARN et retourne dans le noyau par l'intermédiaire d'une interaction avec l'importine β (Askjaer et al., 1998; Dayton, 2004; Henderson and Percipalle, 1997; Meyer and Malim, 1994).

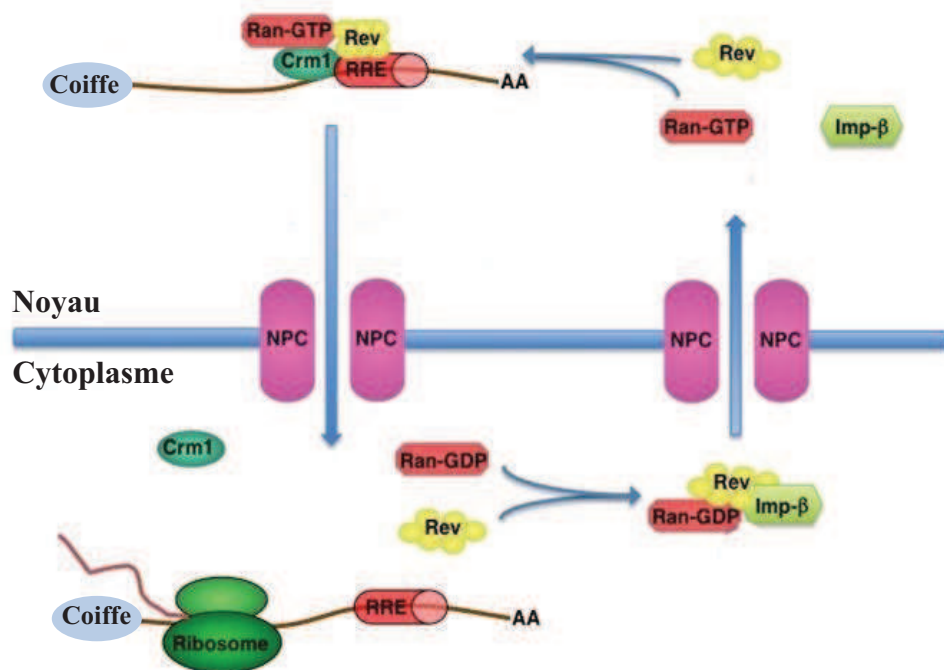


Figure 16: Export nucléaire des ARNm viraux par la protéine Rev. Les ARNm viraux non-épissés (9kb) ou mono-épissés (4 kb) sont exportés vers le cytoplasme grâce à l'interaction de la protéine Rev avec la séquence RRE des ARNm viraux. Le NES de Rev permet l'export nucléaire de l'ARNm viral par le biais des interactions avec des facteurs d'export nucléaire comprenant CRM-1 et Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, l'hydrolyse de Ran-GTP en Ran-GDP permet la libération de l'ARNm. La protéine Rev interagit via son domaine NLS avec un facteur d'import nucléaire, l'importine β , pour entrer de nouveau dans le noyau (Massimo, 2011)

I.3.7. Traduction

Dans le cytoplasme, la machinerie traductionnelle de la cellule hôte est détournée au profit du VIH-1 afin de synthétiser les protéines virales (Bolinger and Boris-Lawrie, 2009). La traduction des précurseurs Gag et Gag-Pol peut être initiée, soit par un mécanisme coiffe-dépendant, soit par un mécanisme IRES-dépendant (Chamond et al., 2010). La synthèse du précurseur Gag-Pol est obtenue par un décalage du cadre de lecture des ribosomes en fin de traduction de la protéine Gag (Brierley and Dos Ramos, 2006; Jacks et al., 1988).

La synthèse des protéines Env et Vpu est obtenue à partir d'un ARNm bicistronique contenant deux phases ouvertes de lecture chevauchantes: vpu et env. La traduction de la protéine Env dépend d'un mécanisme appelé « leaky scanning » (Schwartz et al., 1990; Schwartz et al., 1992).

I.3.8. Assemblage

Gag est l'acteur principal de cette étape du cycle viral. Bien que la seule expression de Gag suffise pour former des pseudo-particules virales, la production des virions infectieux nécessite l'encapsidation de l'ARN génomique, l'incorporation de la protéine Env et du précurseur Gag-Pol (Campbell and Rein, 1999; Gheysen et al., 1989; Mergener et al., 1992). Dans la plupart des cellules, y compris les lymphocytes CD4 (+), l'assemblage a lieu à la membrane plasmique (**Figure 17-2 et 7**). Cependant, dans les macrophages, l'assemblage a lieu au niveau de compartiments intracellulaires (Orenstein et al., 1988) apparentés à des endosomes tardifs : les corps multivésiculés ou multivesicular bodies (MVB) (Mlcochova et al., 2013; Raposo et al., 2002) (**Figure 17-8**). Par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide, Gag assure l'orchestration de l'incorporation de chacun des composants majeurs constituant les particules virales. L'oligomérisation de Gag (Kutluay and Bieniasz, 2010; Sundquist and Krausslich, 2012) commence suite à l'interaction de l'ARNg avec le domaine NC de Gag. Cette interaction permet l'incorporation spécifique de l'ARN viral dans les particules. Cet ARN constitue un échafaudage pour l'assemblage du VIH-1. En effet, la fixation concomitante de nombreux précurseurs sur l'ARN favorise la multimérisation de Gag, étape nécessaire à l'assemblage des particules. Cet assemblage a lieu dans le cytoplasme où des oligomères compacts de Gag ont été récemment observés. Ces derniers s'assemblent progressivement au cours de leur trafic vers la membrane plasmique pour former des multimères très compacts (El Meshri et al., 2015).

Plusieurs domaines sont impliqués dans les interactions Gag-Gag nécessaires à l'assemblage des particules. En effet, la multimérisation de Gag est principalement médiée par des interactions CA-CA (El Meshri et al., 2015; Kutluay and Bieniasz, 2010; Larson et al., 2003; Nermut et al., 2003). Cependant, les séquences SP1, MA, et NC stabilisent également la multimérisation de Gag (Burniston et al., 1999; Datta et al., 2011; de Rocquigny et al., 2014; Ott et al., 2005).

Les séquences MA et NC agissent par leurs capacités de liaison à l'ARN, mais aussi dans le cas de MA par son groupement myristate et son domaine basique (Chukkapalli et al., 2008; Darlix et al., 2011; O'Carroll et al., 2012; Ono et al., 2004). Comme déjà discuté dans la section I.2, le domaine MA de Gag permet de rassembler Gag, ARN et Env à la membrane plasmique (Alfadhli et al., 2011; Dorfman et al., 1994; Ott et al., 2005). Le rôle de NC dans

l'assemblage et l'encapsulation du génome viral sera expliqué dans la section I.4. Finalement, il faut noter qu'au cours de leur oligomérisation et leur transport vers la membrane plasmique, les protéines Gag sont également associées à des protéines cellulaires telles que Staufen, ABCE1 et DDX6 qui participent à l'assemblage (Reed et al., 2012; Zimmerman et al., 2002).

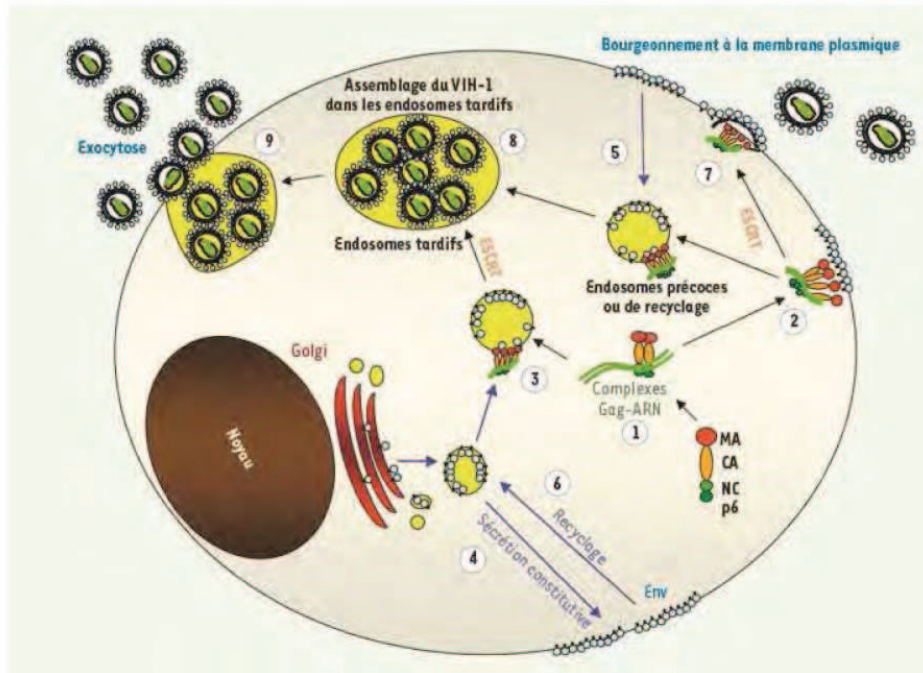


Figure 17 : Trafic et voies d'assemblage du VIH-1:(1) Synthèse et multimérisation de Gag sur l'ARNv (2-3) adressage des complexes Gag-ARN vers la membrane plasmique ou vers les compartiments endosomaux (4-6). Sécrétion et recyclage de l'enveloppe qui est ensuite recrutée par Gag au sein de la particule virale en formation.(7-8) Bourgeonnement des virions stimulé par la machinerie ESCRT (Corbin A, 2008).

I.3.9. Bourgeonnement et maturation de la particule virale

Après l'achèvement de l'assemblage, les virus doivent se détacher de la cellule hôte pour infecter d'autres cellules. Pour cela, le VIH-1 est capable de détourner la machinerie cellulaire pour permettre le bourgeonnement de particules virales immatures. Le bourgeonnement est dirigé par la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required For Transport) (Meng and Lever, 2013; Sundquist and Krausslich, 2012; Votteler and Sundquist, 2013). Grâce à son domaine p6, le précurseur Gag interagit avec des membres de la machinerie ESCRT. La séquence p6 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, et le domaine YPXL (Tyr-Pro-Lys-X, où X désigne un résidu quelconque) qui se lie spécifiquement à la protéine Alix (apoptosis-linked gene 2-interacting protein) (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Usami et al., 2009; VerPlank et al.,

2001 ; Wollert et al., 2009). Les protéines TSG101/ESCRT-I et Alix permettent le recrutement des complexes ESCRT-III (spécifiquement CHMP-2, CHMP-4) et VPS4 (Obita et al., 2007) qui déclenchent la fission de la membrane et la libération du virion de la cellule infectée (Jouvenet et al., 2011; Morita et al., 2011).

Les virions libérés de la cellule infectée ne sont pas infectieux et doivent subir une étape de maturation finale correspondant à une série de clivages des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale (PR) (pour revues voir Bukrinskaya, 2004 et Sundquist and Krausslich, 2012). La maturation virale commence pendant ou immédiatement après le bourgeonnement. L'interaction entre les précurseurs Gag-Pol lors de l'assemblage permet la dimérisation des domaines PR formant un homodimère actif. La PR virale mature est ainsi libérée par un mécanisme auto-catalytique (Debouck et al., 1987). Par la suite, la PR clive Gag et Gag-Pol libérant les protéines structurales (MA, CA, NC, p6) et les enzymes virales (PR, IN, RT) (Wieggers et al., 1998). Au cours de la maturation des virions, la MA reste associée à la membrane, la NC condense l'ARNg et la CA se réassemble pour former la capsid conique. Ces réarrangements structuraux résultent en la formation de virions matures infectieux capables d'infecter de nouvelles cellules (Vogt, 1996). Il est important d'ajouter que la particule virale lors de l'assemblage et le bourgeonnement intégrera, spécifiquement ou non, un nombre important de molécules cellulaires, y compris des ARN et des protéines (Chertova et al., 2006; Linde et al., 2013; Tremblay et al., 1998).

I.4. La protéine de la nucléocapside NCp7

I.4.1. Du précurseur Gag à la protéine NCp7

Dans le cycle viral du VIH-1, la protéine de la nucléocapside existe sous deux formes : soit comme domaine fonctionnel de la polyprotéine Gag (NC-Gag) dans les phases tardives (post-intégration) du cycle viral, soit sous sa forme mature (NCp7 ; 55 a.a. ; 7kDa) dans le virus mature ou les phases précoces du cycle viral.

La forme mature de NC (NCp7) est générée, au sein du virion, par une série de clivages protéiques médiés par la protéase virale (**Figure 18**) (Pettit et al., 2005). L'ordre de clivage est fortement régulé. Le premier clivage se produit entre SP1 et le domaine NC et conduit à la formation de NCp15 qui comprend NCp7-SP2-p6 (Shehu-Xhilaga et al., 2001). La seconde étape de la maturation exige la liaison de NCp15 à l'ARNg (Sheng et al., 1997). Elle permet la génération de NCp9 (composée de NCp7 et de SP2). Finalement, le troisième clivage protéolytique permet la libération de la NCp7 de SP2 (Coren et al., 2007; Henderson et al., 1992). En parallèle des deux derniers clivages, la protéase coupe les autres fragments de Gag pour donner MA, CA et SP1.

Après l'achèvement de la maturation de Gag, la capsid virale contient 1500 à 2000 molécules de NCp7 liées aux deux copies de l'ARN viral, ce qui correspond à une concentration locale de l'ordre du millimolaire, avec une stœchiométrie d'une molécule pour 8-9 nucléotides (nt) (Darlix et al., 2011).

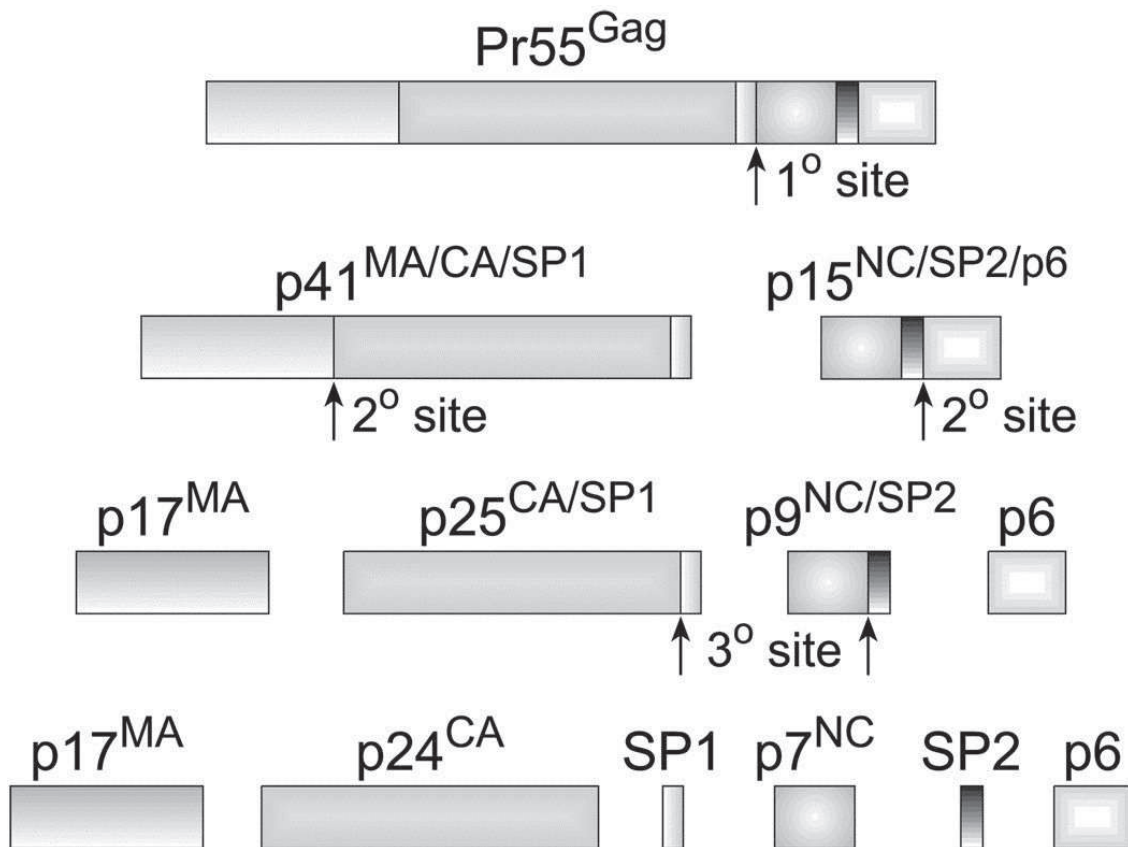


Figure 18 : Représentation schématique du processus de maturation de Gag. Le domaine NC existe sous quatre formes : NC-Gag, NCp15, NCp9 et NCp7 (Thomas and Gorelick, 2008).

I.4.2. Structure de la NCp7

La NCp7 est une protéine basique de 55 a.a. contenant deux motifs en doigts de zinc (ZF pour Zinc Finger) de type CCHC (Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys, où X représente des acides aminés variables) reliés par une séquence « linker » et flanqués de deux extrémités N- et C-terminales riches en acides aminés basiques (**Figure 19**). La conservation du motif CCHC au sein de différents rétrovirus témoigne de l'importance de ces doigts de zinc.

Les ZF sont capables de lier le zinc avec une très forte affinité (de l'ordre de 10^{-13} M) (Bombarda et al., 2007; Bombarda et al., 2001; Darlix et al., 2011; Mely et al., 1996). Suite à leur liaison au zinc, les deux doigts se rapprochent dans l'espace via un coude formé par le résidu Pro31 (Morellet et al., 1992; Summers et al., 1992), ce qui permet la transition d'un état aléatoire non structuré vers une forme repliée caractérisée par la formation d'un plateau hydrophobe. Ce dernier, constitué des résidus Val13, Phe16, Thr24 et Ala25 (sur ZF1) et

Trp37, Gln45 et Met46 (sur ZF2), est indispensable pour les fonctions biologiques de la NCp7 (Darlix et al., 2011).

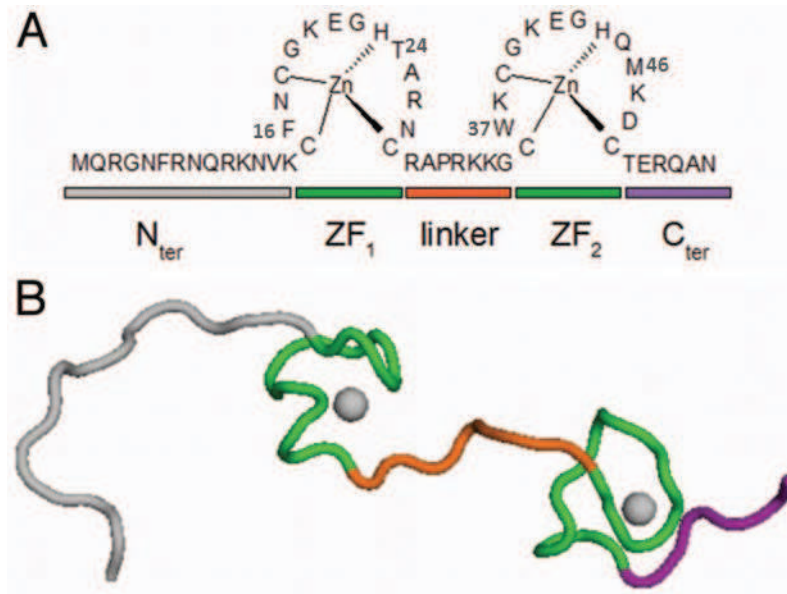


Figure 19: Structure tridimensionnelle et séquence de la protéine NCp7 du VIH-1. (A) Séquence de la NCp7. Les deux doigts de zinc (ZF) sont représentés en vert, le linker basique en orange, et les extrémités N- et C-terminales sont représentées en gris et violet, respectivement. (B) Structure en 3D de la NCp7 (Godet et al., 2012; Godet and Mely, 2010).

L'importance biologique des doigts de zinc a été soulignée par plusieurs études qui ont montré que des mutations affectant les doigts de zinc ont une répercussion négative sur le cycle rétroviral (Demene et al., 1994; Dorfman et al., 1993; Gorelick et al., 1993). En effet, la substitution de l'His23 par une cystéine réduit l'affinité de la protéine pour l'ARNg et pour l'ARNt^{Lys3} conduisant à la formation de particules virales non infectieuses.

I.4.3. La liaison de la NCp7 aux acides nucléiques

La NCp7 est capable de se lier spécifiquement ou non spécifiquement à presque toute séquence d'acide nucléique (AN). Cette liaison est fortement dépendante des conditions salines (Fisher et al., 1998; Mely et al., 1995; Urbaneja et al., 1999). Les quinze résidus basiques de NCp7 sont responsables des interactions non-spécifiques principalement électrostatiques qui permettent à la NCp7 de se lier à n'importe quelle séquence de 6 nucléotides (Lapadat-Tapolsky et al., 1995; Mely et al., 1995). D'autre part, un certain nombre d'interactions spécifiques NCp7/ANs ont été décrites dans la littérature (Berglund et al., 1997; Bourbigot et al., 2008; De Guzman et al., 1998; Urbaneja et al., 2002; Vuilleumier et al.,

1999; Wu et al., 1997). La NCp7 se lie préférentiellement avec une bonne affinité à des séquences simple brin (ADN et ARN) riches en UG- ou TG- et aux séquences GXG au sein des boucles simple brin (X correspond à une base quelconque) (Avilov et al., 2009; Avilov et al., 2008; Fisher et al., 1998; Vuilleumier et al., 1999). Le plateau hydrophobe situé à la surface des ZF est responsable de ces interactions spécifiques. Plus spécifiquement, elles impliquent les résidus Phe16 (ZF1) Trp37 (ZF2) qui forment des empilements avec les bases nucléotidiques (Lam et al., 1994; Mely et al., 1993; Morellet et al., 1994; Vuilleumier et al., 1999). Ces interactions spécifiques jouent un rôle important dans la reconnaissance du signal d'encapsidation Psi de l'ARNg permettant, au cours de l'assemblage du virus, sa sélection, par Gag parmi les ARNs cellulaires (Hagan and Fabris, 2003; Lever et al., 1989; Maki et al., 2001; Muriaux and Darlix, 2010; Paoletti et al., 2002).

I.4.4. Activité chaperonne de la NCp7

Les séquences d'ANs adoptent des milliers de conformations différentes; cependant, la plupart de ces conformations sont biologiquement inactives. La forme biologiquement active est généralement la conformation thermodynamique la plus stable (Treiber and Williamson, 2001). Le rôle des protéines chaperonnes d'ARN et/ou d'ADN consiste à assister les ANs pour qu'ils atteignent leur conformation la plus stable. Les protéines chaperonnes sont présentes dans tous les organismes vivants, y compris les virus où elles jouent des fonctions vitales notamment lors des processus de réplication des ANs (Cristofari and Darlix, 2002; Schroeder et al., 2004; Zuniga et al., 2009).

Les premières protéines chaperonnes d'ARN d'origine virale mises en évidence sont les protéines de la nucléocapside des rétrovirus aviaires et murins : NCp10 de MuLV (Murine Leukemia Virus) et NCp12 de RSV (Rous Sarcoma Virus) (Prats et al., 1988). L'activité chaperonne de la NCp7 du VIH-1 a par la suite été démontrée (Darlix et al., 1990; Dib-Hajj et al., 1993). Elle repose sur trois propriétés : (i) la capacité à induire l'agrégation des ANs et la formation de complexes nucléoprotéiques, (ii) la capacité à déstabiliser partiellement les structures secondaires des ANs de façon ATP-indépendante, et (iii) la capacité de se lier de manière non spécifique à des structures d'ANs très différentes (Darlix et al., 2011).

Il est à noter que la polyprotéine Gag et ses produits de clivages (NCp15 et NCp9) possèdent également une activité chaperonne. Des études comparatives des activités chaperonnes de Gag, NCp15, NCp9 et NCp7 (Feng et al., 1999) ont montré que NCp7 a une meilleure activité

chaperonne que Gag, alors que les activités chaperonnes de NCp15, NCp9 et NCp7 augmentent avec l'état de leur maturation (Cruceanu et al., 2006; Rein, 2010; Wu et al., 2010).

Enfin, il a été mis en évidence que l'activité chaperonne de la NCp7 varie en fonction du rapport molaire NCp7:NA (**Figure 20**) qui détermine le niveau d'occupation par la NCp7 des séquences d'ANs. On distingue trois niveaux d'occupation et donc, trois modes distincts d'activité de la NCp7 (Auxilien et al., 1999; Cristofari and Darlix, 2002; Ivanyi-Nagy et al., 2005; Stoylov et al., 1997) : (i) un taux d'occupation faible (1 NC :100nt), NCp7 se lie avec une grande affinité à des séquences virales spécifiques, mais sans exercer une activité chaperonne, (ii) un taux d'occupation moyen, l'agrégation et les réarrangements structuraux des ANs vers leur conformation la plus stable par la NCp7 devient possible, (iii) un taux d'occupation très élevé (1NC :5nt ou 1NC :2nt), NC recouvre entièrement les ANs et les protège de la dégradation en formant un complexe nucléoprotéique compact.

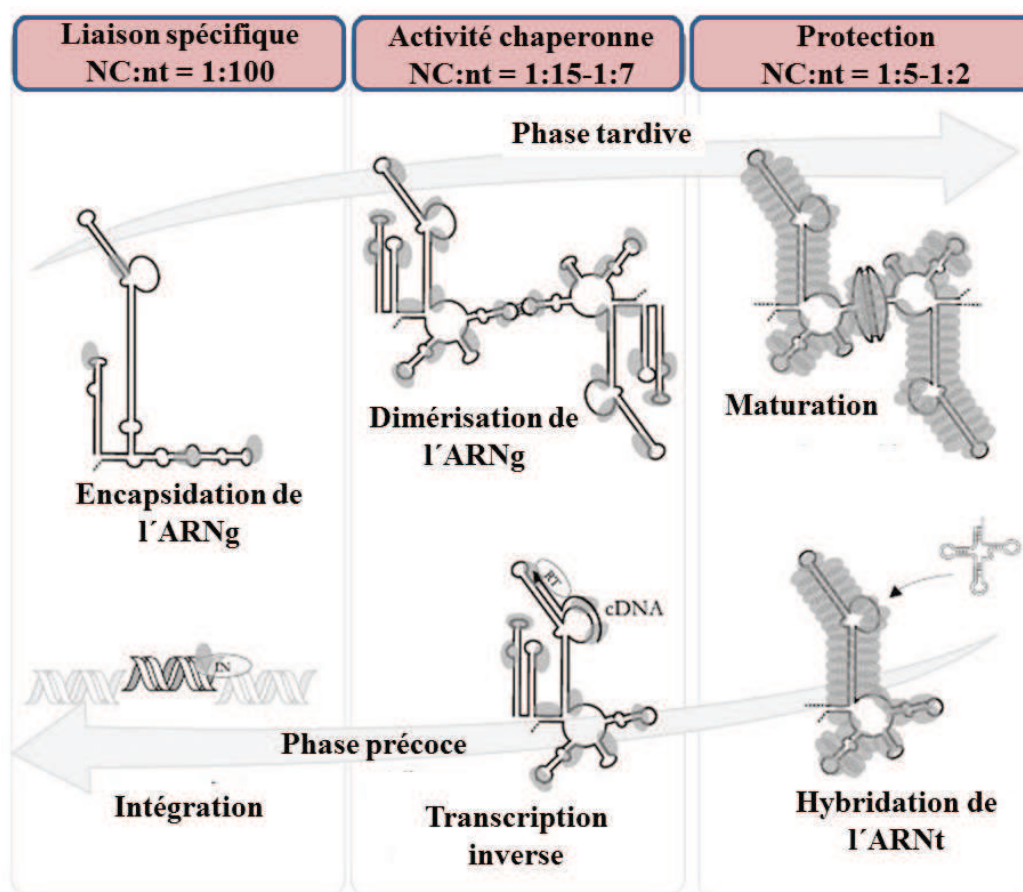


Figure 20 : Liaison et activité chaperonne de la NC en fonction du degré d'occupation des séquences d'ANs. Le taux d'occupation de NC : nt (mol : mol) est compris entre 1 :100 à 1 :2 définissant la fenêtre d'activité de la NCp7, allant de la simple liaison, à l'activité chaperonne et finalement à la protection des acides nucléiques. Adaptée de Darlix et al., 2011.

I.4.5. Les fonctions de NC dans le cycle viral du VIH-1

L'activité chaperonne de la NC explique le rôle crucial joué par cette protéine dans les deux phases précoces et tardives du cycle viral.

I.4.5.1. Les fonctions de la NCp7 dans la phase précoce

I.4.5.1.1. Rôle de la NCp7 au cours de la transcription inverse

La transcription inverse est l'étape du cycle viral où les fonctions chaperonnes de la NCp7 ont été le mieux caractérisées et semblent être le plus impliquées. La capacité de la NCp7 à déstabiliser et à hybrider les séquences d'ANs est en effet importante pour faciliter plusieurs étapes de la transcription inverse.

Rôle au cours de l'initiation de la transcription inverse

L'initiation de la transcription inverse requiert l'hybridation de l'ARNt^{Lys3} cellulaire aux nucléotides complémentaires de la séquence PBS. Il a été montré que la génération de ce complexe d'initiation est stimulée par la présence du domaine NC de Gag (Cen et al., 1999; Cruceanu et al., 2006) ou de NCp7 mature (Chan et al., 1999; De Rocquigny et al., 1992; Hargittai et al., 2001; Lapadat-Tapolsky et al., 1993; Tisne et al., 2004). La formation de l'hybride ARNt^{Lys3}/PBS nécessite l'hybridation de 18nt de l'extrémité 3' de l'ARNt. Cela implique deux réarrangements majeurs : (i) un échange de brin pendant lequel une hélice intra-moléculaire de l'ARNt est convertie en une double hélice d'ARN inter-moléculaire entre ARNt et PBS ; (ii) l'ouverture de la structure tertiaire de l'ARNt qui est suivie d'une ré-hybridation des bases de l'ARNt à celles du PBS pour donner une forme thermodynamiquement plus stable. Ces réarrangements ont une forte barrière d'activation rendant la réaction quasi impossible à température physiologique. La NCp7 facilite l'hybridation de l'ARNt^{Lys3} sur le PBS en agrégeant les ANs. La vitesse d'hybridation ARNt^{Lys3}/PBS est augmentée d'un facteur 10⁵ en présence de la NCp7 (Tisne et al., 2001, 2004; Hargittai et al., 2001).

Lors de la transcription inverse, l'ADN synthétisé est souvent incomplet en raison de pauses de la RT au niveau de sites spécifiques sur la matrice d'ARN génomique viral (Arts et al., 1995; DeStefano et al., 1992; Dudding et al., 1991; Klarmann et al., 1993; Messer et al., 1985; Wu et al., 1996). L'ajout de la NCp7 réduit considérablement les pauses de la RT (**Figure**

21), ce qui augmente l'efficacité de production de l'ADN de pleine longueur (Ji et al., 1996; Wu et al., 1996). Ceci est expliqué par les propriétés chaperonnes de la NCp7, qui élimine les structures secondaires gênant le processus de transcription inverse (Rein et al., 1998).

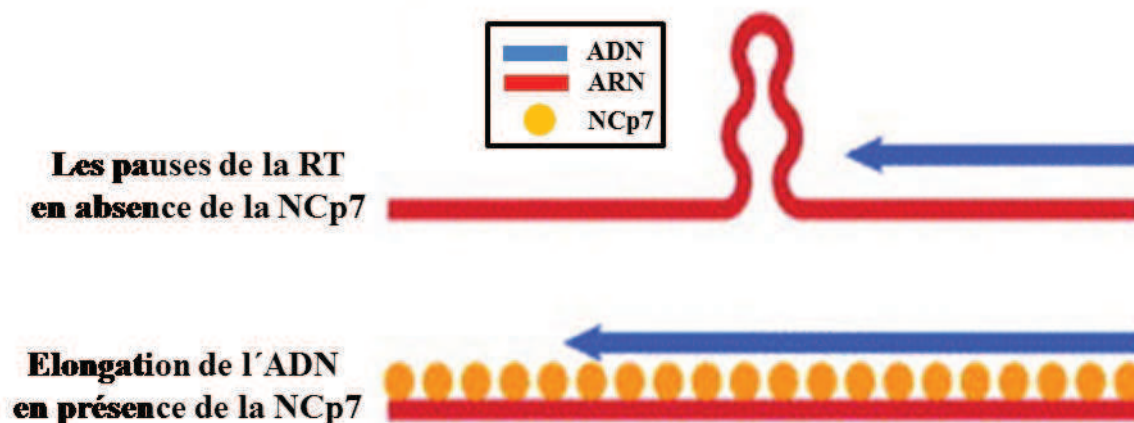


Figure 21 : Effet de la NCp7 sur l'élongation de l'ADN au cours de la transcription inverse. L'addition de la NCp7 réduit les pauses de la transcriptase inverse en déstabilisant les structures secondaires présentes dans la matrice ARN qui altèrent le processus de transcription inverse. Adaptée de Rein et al., 1998.

Rôles au cours du premier saut de brin

Le premier transfert de brin est une étape obligatoire pour la formation du brin d'ADN(-) (Voir la section I.3 du manuscrit où la transcription inverse est détaillée). Cette étape repose sur le transfert de l'ADN strong-stop(-) nouvellement synthétisé de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' de l'ARNg (**Figure 12, étape 3**). Ce transfert est possible grâce à l'hybridation des séquences redondantes R présentes aux extrémités de l'ARNg et du brin ADN (-).

Les propriétés chaperonnes de la NCp7 sont particulièrement importantes pour l'hybridation des séquences TAR et cTAR qui sont des structures en tige-boucle localisées dans la région R de l'ARNg (Voir **Figure 6**) et l'ADN strong-stop(-), respectivement. L'utilisation d'un système *in vitro* pour étudier la transcription inverse, a montré que, dans les conditions physiologiques et en absence de NCp7, le transfert du brin est inefficace en raison de la stabilité de la tige-boucle TAR qui empêche son hybridation avec la séquence complémentaire cTAR (Lapadat-Tapolsky et al., 1995; You and McHenry, 1994). Cependant, l'ajout de NCp7 induit une déstabilisation des structures secondaires de TAR et cTAR (Azoulay et al., 2003; Bernacchi et al., 2002) accélérant ainsi leur hybridation et le premier

transfert de brin (Allain et al., 1994; Darlix et al., 1993; Guo et al., 1997; Kim et al., 1997; Peliska et al., 1994; You and McHenry, 1994). De plus, NCp7 stimule l'activité RNase H de la RT sur les duplex ARN/ADN (Roda et al., 2003).

Rôle au cours du second transfert de brin

Au cours de la transcription inverse, le second transfert de brin permet l'hybridation du brin d'ADN strong stop(+) avec la séquence PBS(-) située en 3' de l'ADN (**Figure 12, étape 7**). Cette étape permet la formation du LTR en 5' et la fin de la synthèse du brin ADN(+). La NCp7 joue un rôle important dans ce transfert en se liant à la séquences PBS, mais contrairement au premier transfert de brin la NCp7 ne déstabilise que très peu la tige PBS (Egele et al., 2004). En l'absence de NCp7, PBS(+) s'hybride principalement à PBS(-) par l'intermédiaire d'une étape de nucléation au niveau de l'extrémité simple brin (interaction de type zipper), alors qu'en présence de NCp7 l'hybridation est facilitée et stimulée par l'intermédiaire d'une étape de nucléation au niveau de leurs boucles. La réaction est accélérée en présence de NCp7 d'un facteur 60 (Egele et al., 2005; Egele et al., 2004; Ramalanjaona et al., 2007) (**Figure 22**).

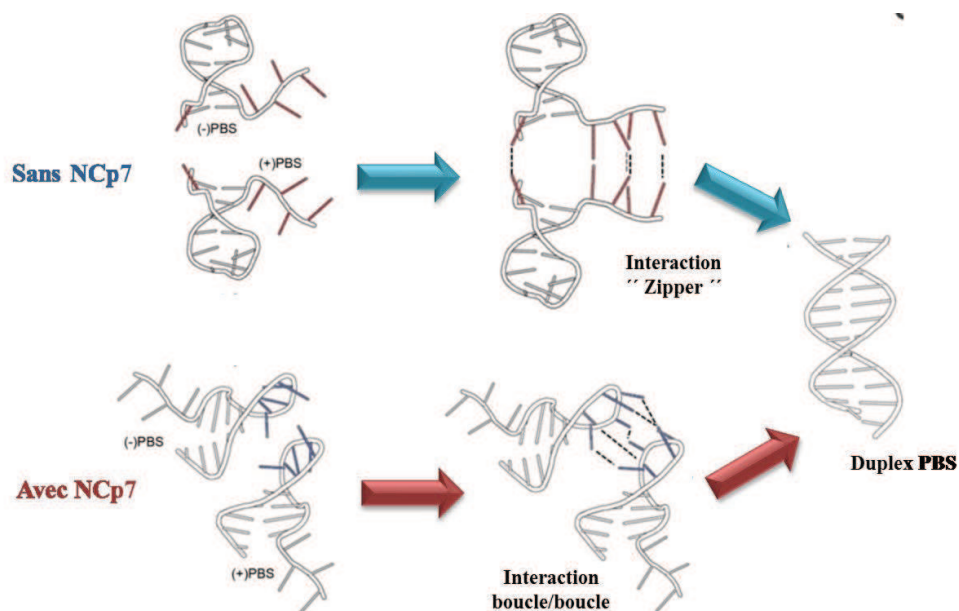


Figure 22 : Mécanisme d'hybridation des séquences PBS(-)/(+). En absence de NCp7, les bases des boucles PBS(-) et PBS(+) sont orientées vers l'intérieur ce qui rend impossible une interaction boucle/boucle et permet une interaction zipper suite à la liaison des séquences protrudentes. L'ajout de NCp7 permet d'étendre la boucle et expose ses bases vers l'extérieur favorisant ainsi une interaction boucle/boucle. Adaptée de Godet et al., 2011.

I.4.5.1.2. Rôle de la NCp7 dans l'intégration de l'ADN viral

Bien que la présence de la NCp7 au sein du PIC reste toujours un sujet de controverse, plusieurs études ont montré son implication dans la protection et l'intégration de l'ADN viral. En effet, lors de son transport dans le cytoplasme en direction du noyau, plusieurs molécules de NCp7 couvrent cet ADN et le protègent de la dégradation par les nucléases (Krishnamoorthy et al., 2003; Lapadat-Tapolsky et al., 1993; Tanchou et al., 1995). Un rôle dans la stimulation de l'intégration de l'ADN viral a également été attribué à la NCp7 (Buckman et al., 2003; Carreau et al., 1997; Poljak et al., 2003; Thomas et al., 2006). Ceci a été démontré *in vitro* (Carreau et al., 1997; Carreau et al., 1999) et *in vivo*. Finalement, certains mutants de la NCp7 (comme le mutant NC H23C) se sont avérés défectueux dans la phase d'intégration (Thomas et al., 2006) soulignant encore l'implication de la NCp7 dans cette étape du cycle viral. Toutefois, le mécanisme par lequel la NCp7 influe sur l'intégration *in vivo* n'est pas bien compris. Elle pourrait, comme montré *in vitro*, améliorer directement les étapes enzymatiques d'intégration et aider également la formation d'un complexe fonctionnel pour l'intégration.

I.4.6. Les fonctions de la protéine de nucléocapside dans la phase tardive

I.4.6.1. Rôle du domaine NC de Gag au cours de l'encapsidation du génome viral

L'encapsidation du génome viral par Gag est une étape obligatoire pour la formation de virions infectieux. Parmi tous les ARNs de la cellule, l'ARN génomique est spécifiquement encapsidé (Aldovini and Young, 1990; Cimarelli and Darlix, 2002). Cette encapsidation spécifique est le résultat de l'interaction du domaine NC de Gag avec le signal d'encapsidation ψ situé dans la région 5'-UTR de l'ARNg (Clever et al., 1995; D'Souza and Summers, 2004; Jewell and Mansky, 2000; Lochrie et al., 1997). Le signal d'encapsidation ψ est une séquence de 120 nucléotides présentant une structure secondaire stable composée de quatre tiges boucles SL1 à SL4 (Baudin et al., 1993; Clever et al., 1995; Harrison and Lever, 1992). Des mutations affectant des éléments de cette séquence réduisent de façon significative l'encapsidation du génome viral (Aldovini and Young, 1990; Clever and Parslow, 1997). Il a été montré que l'intégrité des deux doigts de Zn de la NCp7 est indispensable pour une encapsidation efficace du génome viral, impliquant une interaction spécifique du plateau

hydrophobe de la NCp7 avec les boucles SL2 ou SL3 de l'ARN (Amarasinghe et al., 2000; Amarasinghe et al., 2001; De Guzman et al., 1998; Shubsda et al., 2002). Cependant, les deux doigts de Zn ne sont pas fonctionnellement équivalents et le doigt de Zn N-terminal apparaît plus important dans la sélection de l'ARN et l'encapsidation (Gorelick et al., 1993; Schwartz et al., 1997) que le second doigt de zinc. Il est important de noter que l'affinité de NC pour le signal d'encapsidation ψ est structure-dépendant. De plus, l'affinité de Gag est plus élevée pour l'ensemble de la séquence ψ que pour chacune de ses boucles prises séparément (Clever et al., 1995; Clever and Parslow, 1997).

I.4.6.2. Rôle du domaine NC de Gag dans la dimérisation du génome viral

La séquence en tige-boucle DIS est le site majeur d'initiation de la dimérisation du génome viral. Sa conservation de séquence entre les différentes souches de VIH-1 reflète son importance (Haddrick et al., 1996; Laughrea and Jette, 1994; Muriaux et al., 1995; Paillart et al., 1994; Paillart et al., 2004; Skripkin et al., 1994). Par la présence d'une séquence auto-complémentaire dans sa boucle, le DIS initie la dimérisation du génome en formant un complexe boucle-boucle.

Ce processus peut être divisé en deux étapes. La première étape correspond à la formation d'un « kissing complex » suite à l'appariement des bases des séquences palindromiques (GCGCGC pour le VIH-1 du groupe B) de deux motifs SL1 (**Figure 23**), formant ainsi un « Kissing loop dimer » (Dardel et al., 1998; Ennifar et al., 2001; Ennifar et al., 1999). L'étape suivante est la transformation de ce dernier en un duplex étendu plus stable (Ennifar et al., 1999; Girard et al., 1999). Cela est possible par l'ouverture de la tige-boucle induite soit par la protéine NCp7 à température physiologique soit par chauffage (Laughrea and Jette, 1996; Muriaux et al., 1996). Ainsi, NCp7 semble favoriser la formation du duplex étendu (la structure la plus stable) aux températures physiologiques (Feng et al., 1999; Muriaux et al., 1996; Rist and Marino, 2002). Des délétions ou des mutations de la séquence SL1/DIS entraînent une réduction de la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral génomique, et diminuent également la production de virus (Laughrea et al., 1997; Paillart et al., 1996; Paillart et al., 1994).

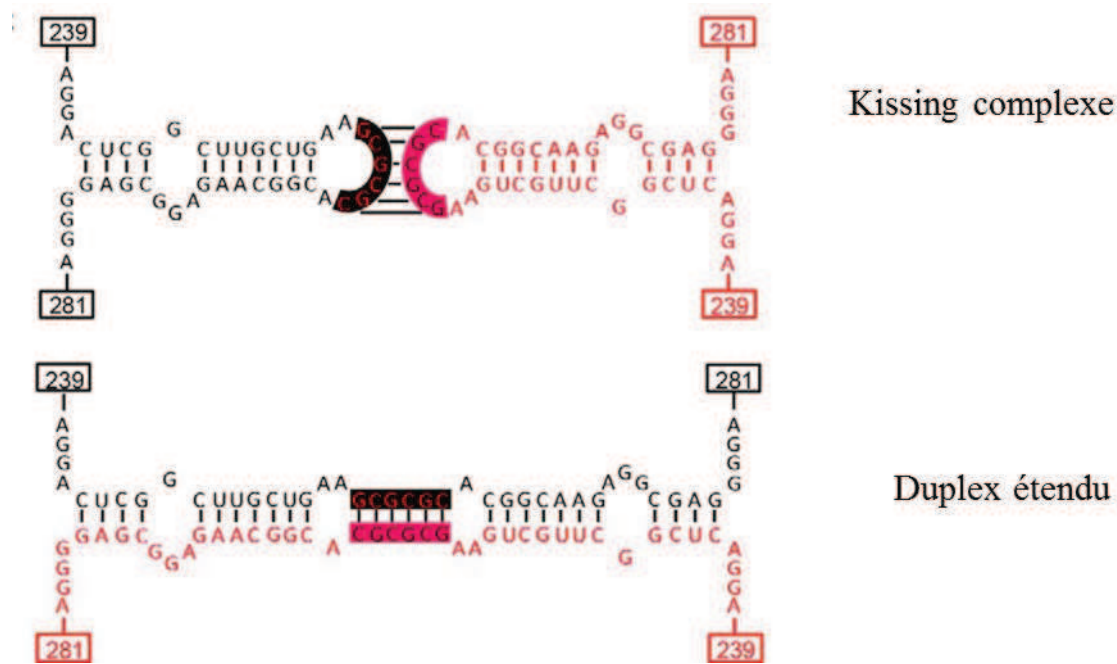


Figure 23 : Représentation schématique de la dimérisation de la séquence DIS. Représentation schématique de la conversion de la séquence DIS induite par NC à partir du kissing complexe au duplex étendu. Adaptée de van Bel et al., 2014.

Il est à noter que DIS n'existe pas toujours sous forme de tige-boucle dans l'ARN viral. En effet, deux structures secondaires ont été proposées pour la région 5'-UTR du VIH-1 (**Figure 24**), dans lesquelles les éléments fonctionnels sont soit accessibles soit masqués. La structure LDI (Long Distance Interaction) orienterait l'ARNg vers la traduction alors que la BMH (Branched multiple hairpin) permettrait la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg (Abbink and Berkhout, 2003; Berkhout et al., 2002; Huthoff and Berkhout, 2001). Des rôles de la NCp7 dans la réorganisation de la structure du 5'-UTR et dans la régulation de la dimérisation et la traduction de l'ARN viral ont été décrits (Huthoff and Berkhout, 2001).

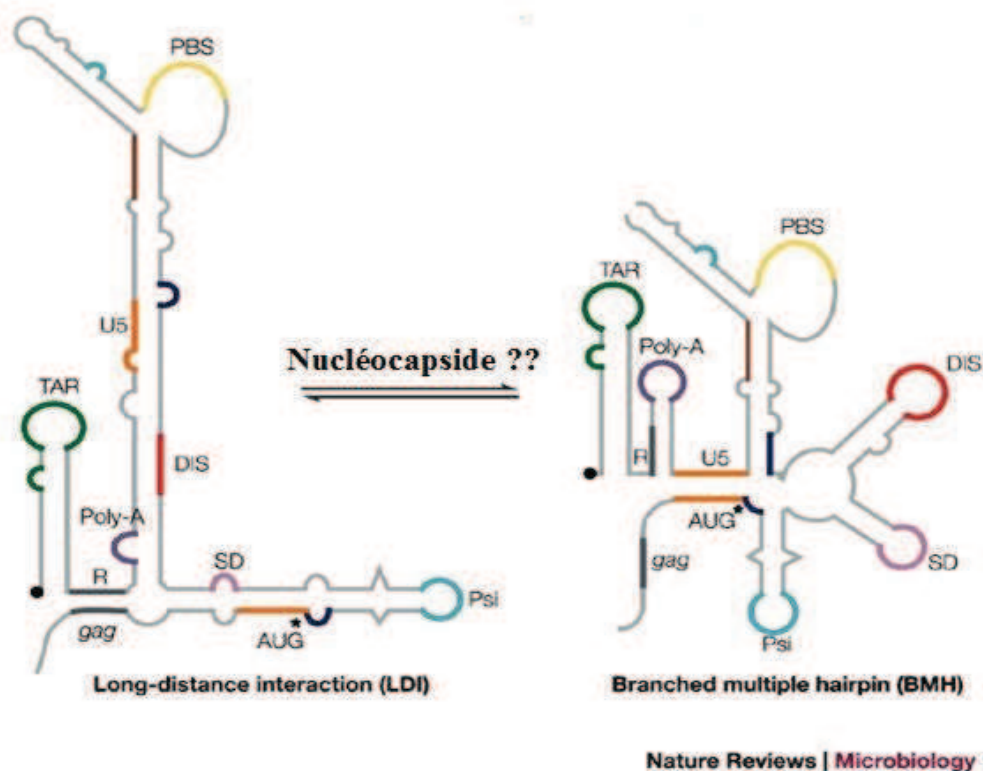


Figure 24 : Equilibre entre les conformations LDI (Long Distance Interaction) et BMH (Branched Multiple Hairpin) de la région 5'-UTR permettant de masquer ou d'exposer, respectivement le signal de dimérisation (Paillart et al., 2004).

I.4.6.2.1. Rôle du domaine NC de Gag dans l'assemblage du virus

En parallèle de son encapsidation et sa dimérisation, le génome est transporté à la membrane plasmique et joue un rôle d'échafaudage pour l'assemblage des protéines Gag. Le domaine NC de Gag joue un rôle clé dans cet assemblage puisque sa délétion ou la délétion des deux doigts de zinc entraînent une altération de l'oligomérisation de Gag et retarde la production des particules, en comparaison avec la Gag sauvage (de Rocquigny et al., 2014; El Meshri et al., 2015; Muriaux and Darlix, 2010; Ott et al., 2009). Le rôle de NC-Gag dans l'assemblage est fortement lié à sa capacité de former avec l'ARN viral un échafaudage pour l'oligomérisation de Gag (Alfadhli et al., 2005; Cimarelli and Darlix, 2002; Jouvenet et al., 2009; Jung et al., 2002; Ott et al., 2009). Cette interaction ARN/NC semble être non spécifique (Campbell and Rein, 1999) et principalement médiée par les résidus basiques de NC plutôt que par les doigts de Zn (Cimarelli et al., 2000; Ott et al., 2009).

Une étude récente effectuée dans notre laboratoire par El Meshri et al a démontré un rôle du domaine NC de Gag dans le transport des oligomères de Gag à la membrane plasmique (El Meshri et al., 2015). Ceci est probablement réalisé par l'intermédiaire de l'interaction de NC-Gag avec les protéines du cytosquelette (actine, tubuline) et les protéines motrices cellulaires tels que KIF4 (Jolly et al., 2007; Liu et al., 1999; Martinez et al., 2008). En outre, NC-Gag interagit avec les phospholipides chargés négativement lors de la liaison de Gag, probablement sous sa forme en U (compacte), à la membrane plasmique (Kempf et al., 2015).

I.4.7. Interactions de la nucléocapside avec les protéines cellulaires

NC au sein du Gag interagit avec plusieurs protéines cellulaires (Staufen1 / ABCE1 / le domaine Bro1 d'Alix / actine / nucléoline / APOBEC3G, etc.) en particulier pendant la phase tardive du cycle viral (Friedrich et al., 2011; Mirambeau et al., 2010; Muriaux and Darlix, 2010).

L'actine interagit avec la partie N-terminale de la NC, à la fois sous sa forme mature NCp7 ou comme un domaine de Gag (NC-Gag) (Liu et al., 1999; Wilk et al., 1999). Cette interaction interviendrait dans le bourgeonnement viral et permettrait l'incorporation de l'actine dans le virus (Ott, 2008). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour caractériser cette interaction et déterminer son implication fonctionnelle pour VIH-1.

La nucléoline est une protéine nucléolaire qui est relocalisée à la membrane plasmique des cellules infectées par VIH-1 (Ueno et al., 2004). Elle semble jouer un rôle dans le transport nucléocytoplasmique de l'ARNg (Cochrane et al., 2006). En interagissant avec NC-Gag et la région Psi de l'ARN génomique, elle pourrait favoriser l'assemblage, le bourgeonnement et la libération de particules virales (Bacharach et al., 2000)

ALIX est une protéine de la famille des ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required For Transport) jouant un rôle dans le bourgeonnement du virus. Elle interagit avec le domaine p6 (via son motif YPXL) d'une part et avec le NC-Gag via son domaine Bro1 d'autre part permettant le recrutement de la machinerie ESCRT, ce qui facilite la libération des particules virales (Dussupt et al., 2009; Popov et al., 2009).

La protéine Staufen1 joue un rôle dans le trafic et le métabolisme de l'ARNm. Staufen1 est recrutée par le domaine NC de Gag, plus particulièrement par les doigts de zinc (Chatel-Chaix et al., 2008), et participe à l'encapsidation de l'ARNg et au recrutement des protéines cellulaires impliquées dans l'assemblage. De plus, Staufen1 est incorporée dans le virus (Chatel-Chaix et al., 2004; Mouland et al., 2000).

La protéine cellulaire ABCE1 est un membre de la superfamille des transporteurs ABC (ATP-Binding cassette) qui transporte des molécules à travers les membranes cellulaires. Elle se lie à Gag, directement après sa traduction, via les résidus basiques du domaine NC (Lingappa et al., 2006) et assisterait Gag dans les premières étapes de l'assemblage viral (Zimmerman et al., 2002).

Par ailleurs, NC-Gag interagit probablement avec des facteurs de restriction tels que la PrP (Prion Protein) et hDlg1 (Human Disc Large Protein). PrP est une protéine chaperonne d'ARN qui affecte négativement la production de virions (Gabus et al., 2001; Leblanc et al., 2004). La protéine hDlg1 humaine module la distribution de Gag à la membrane plasmique et affecte l'infectivité des particules (Perugi et al., 2009).

Enfin, des cribles génétiques ont identifié plus de 1000 protéines cellulaires qui peuvent interagir avec le domaine NC. Cependant, ces interactions doivent être validées et leurs rôles fonctionnels caractérisés (Brass et al., 2008; Jager et al., 2012; Konig et al., 2008; Zhou et al., 2008).

I.4.8. Les inhibiteurs ciblant les fonctions de la NCp7

On compte plusieurs types d'inhibiteurs de la NCp7 qui sont souvent classés suivant leur capacité à éjecter ou à ne pas éjecter le zinc lié à la protéine.

Les éjecteurs de zinc

La majorité de ces inhibiteurs agissent de manière stœchiométrique principalement par une attaque électrophile du groupement thiol (SH) des cystéines des deux doigts de zinc engendrant des ponts disulfures entre ces dernières ce qui provoque l'éjection du zinc résultant en la perte de la structure de la NCp7 et par conséquent en la diminution de l'infectivité du VIH-1. Le premier éjecteur de zinc décrit est le 3-nitrobenzamide (NOBA) (Rice et al., 1993). Cette molécule a été le point de départ pour la synthèse d'autres molécules éjecteurs de zinc (pour revues voir (de Rocquigny et al., 2008; Garg and Torbett, 2014;

Goldschmidt V, 2010; Turpin et al., 2008)) comme le disulfide benzamide (DIBA) (Rice et al., 1995), azodicarbonamide (ADA) (Rice et al., 1997), le pyridinioalkanoyle thioester (PATE) (Turpin et al., 1999) et le s-acyl-2-mercaptopbenzamide thioester (SAMT).

De par la forte conservation des doigts de zinc, ces différentes molécules montrent une très bonne activité antivirale sur de nombreuses souches du VIH-1. Par leur capacité à altérer les propriétés chaperonnes de la NCp7, elles affectent majoritairement la transcription inverse (Morcock et al., 2005; Pannecouque et al., 2010). De plus il a été montré que certains de ces inhibiteurs, notamment les DIBA, SAMTs et PATEs, affectent également la phase tardive du cycle viral menant à la libération de virus non infectieux (Turpin et al., 1996).

Le plus grand problème de ces inhibiteurs est leur grande toxicité cellulaire résultant de leur action non spécifique sur des protéines cellulaires contenant des doigts de zinc. En conséquence, même si deux de ces inhibiteurs (l'ADA et le DIBA-4) furent inclus dans des essais cliniques, aucun n'a atteint la phase clinique de par leur forte toxicité cellulaire (Goebel et al., 2001; Turpin, 2003). Ces molécules, en particulier les SAMT, sont toutefois toujours considérées comme de potentiels microbicides topiques capables de prévenir la transmission du VIH-1 (Wallace et al., 2009).

Les non éjecteurs de zinc

Cette classe d'inhibiteurs peut être divisée en deux grandes familles de molécules suivant qu'ils lient la NCp7 ou le partenaire de la NCp7

Les inhibiteurs liant la NCp7

La spécificité limitée des éjecteurs de zinc vis-à-vis de la NCp7 a incité à la recherche de composés capables de se lier à la NCp7 sans aucune propriété d'éjection de zinc. Un premier criblage (Stephen et al., 2002) basé sur l'inhibition de la liaison de la NCp7 à des oligonucléotides contenant des répétitions TG a conduit à l'identification de dérivés de la tetrachlorogallein qui se lient et inhibent stoechiométriquement les propriétés chaperonnes de la NCp7. Les composés les plus actifs, comme la "Gallein", présentaient une activité de l'ordre du nanomolaire sur une NCp7 libre mais n'ont pas montré d'activité sur la NCp7 liée à un ADN ce qui suggère qu'ils présentaient un effet antagoniste contre la NCp7 libre seulement. Un autre criblage moléculaire à haut débit de 4800 molécules, basé sur la capacité

de la NCp7 à déstabiliser la séquence cTAR, (Azoulay et al., 2003; Bernacchi et al., 2002) a permis de sélectionner cinq composés présentant des valeurs d'IC50 dans la gamme du micromolaire. Ces composés empêchent la liaison de la NCp7 à cTAR par interaction directe avec les doigts de zinc, mais sans entraîner l'éjection du zinc (Shvadchak et al., 2009).

Bien que ces inhibiteurs de la NCp7 soient potentiellement intéressants, il est nécessaire de mieux comprendre leur mécanisme d'action, d'améliorer leur liaison à la NCp7 et de démontrer leur activité antivirale.

Une activité anti-NCp7 a été mise en évidence chez des petits oligonucléotides méthylés (mODNs) riches en GU imitant de courtes séquences des LTR. Ces mODNs altèrent l'activité chaperonne de la NCp7 et/ou la synthèse de l'ADN viral ce qui résulte en une inhibition de l'infection virale et de la réplication. L'étude approfondie de l'interaction a permis de montrer que ces mODNs se lient à la NCp7 via des interactions non-électrostatiques et sont capables d'entrer en compétition avec les ANs en s'insérant dans la poche hydrophobe de la NCp7. Malheureusement, lors de tests à long terme, des souches virales résistantes aux mODNs sont apparues, conduisant à l'arrêt de leur développement (Avilov et al., 2012; Grigorov et al., 2011).

Les inhibiteurs des activités de la NCp7 liant l'ARN

La seconde stratégie d'inhibition de la NCp7 consiste à cibler les différents partenaires cellulaires de la protéine. Ces molécules réparties dans plusieurs classes (aminoglycosides, intercalant, peptides) se lient aux sites préférentiels de la NCp7 sur l'ARN viral, tels que la tige boucle SL1 (Chung et al., 2008; Chung et al., 2010), la tige boucle SL3 (Warui and Baranger, 2009) ou encore les séquences TAR et PBS (Alice Sosic, 2013) ce qui permet l'inhibition spécifique de l'interaction de la NCp7 avec ces séquences d'ANs cibles et/ou la dissociation des complexes déjà formés. L'activité de ces molécules rend ces derniers suffisamment intéressants pour la réalisation d'études approfondies visant à identifier, *in vivo*, leur mécanisme d'action dans le but de concevoir une nouvelle génération de molécules antirétrovirales.

L'utilisation des peptides comme des inhibiteurs anti-NCp7 est détaillée dans la section IV.3.1.

II. Les objectifs de la thèse

La protéine de la nucléocapside du VIH-1 joue un rôle important dans les phases précoces (sous sa forme NCp7 mature) et tardives du cycle viral (sous forme de domaine NC de Gag, NC-Gag). Le rôle crucial de la NC est principalement lié à ses propriétés chaperonnes des acides nucléiques en permettant leur réarrangement dans leur conformation thermodynamiquement la plus stable. Lors de son entrée dans la cellule, le virus libère dans le cytoplasme un complexe de transcription inverse (RTC) composé de l'ARN viral recouvert de NCp7 et de plusieurs autres protéines virales et cellulaires. La NCp7 joue alors son premier rôle de protection de l'ARN des nucléases cellulaires. Lors de son transport vers le noyau et de la transcription inverse de l'ARN génomique en ADN viral, le RTC évolue progressivement vers le complexe de préintégration (PIC), qui est considéré comme pilotant l'entrée dans le noyau et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Au sein de Gag, le domaine NC joue un rôle dans la sélection, l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral et par conséquent dans l'assemblage et le bourgeonnement de nouvelles particules.

Outre ses fonctions chaperonnes des acides nucléiques bien connus, beaucoup de questions au sujet de la NC restent sans réponse et sujets de débats ceci est particulièrement le cas de sa localisation dans les cellules. En effet, peu d'informations sont disponibles sur la distribution intracellulaire de la NCp7 dans les cellules infectées. Dans un contexte d'infection, la NCp7 a, d'une part, été détectée dans la fraction nucléaire des cellules infectées et d'autre part, des expériences d'immunofluorescence ont montré que la NCp7 s'accumule dans le noyau des cellules infectées dès 18 h post infection (Gallay et al., 1995; Zhang and Crumacker, 2002). Ces deux études n'ont pas défini sous quelle forme (associée au PIC, à d'autres protéines cellulaires ou virales ou à des ARNs cellulaires) se trouvait cette protéine. Dans ce contexte, la présence de la NCp7 au sein du PIC est également un sujet de controverse, puisqu'elle n'a jamais été détectée au sein de PIC isolés biochimiquement (Nermut and Fassati, 2003; Thomas and Gorelick, 2008). Toutefois, ces résultats peuvent être liés aux conditions utilisées pour isoler les PICs (Arhel, 2010 ; Miller et al., 1997), à la faible affinité de la NCp7 pour l'ADN viral (Lyonnais et al., 2013; Mirambeau et al., 2007) et aux techniques employées pour révéler la NCp7 (Thomas and Gorelick, 2008). A l'inverse, la présence de la NCp7 dans le PIC est possible si l'on considère sa haute concentration (1500 molécules dans le RTC) et sa présence dans le noyau dès 6 heures après infection (Gallay et al., 1995; Zhang and Crumacker, 2002). De plus, l'infection par des virus portant une ou plusieurs mutations au

niveau des ZFs de la NCp7 est abortive par défaut d'intégration de l'ADN viral suggérant un rôle de cette dernière dans une étape exclusivement nucléaire du cycle viral.

Afin de répondre à toutes ces questions débattues concernant le devenir de la NCp7 dans les cellules infectées, des études supplémentaires sont nécessaires pour retracer le parcours de cette protéine virale, très importante pour le VIH-1, dans les cellules infectées.

Dans le laboratoire, nous nous intéressons à l'étude de la localisation de la NCp7 dans les cellules. Dans un premier temps, cette localisation a été étudiée dans un contexte de surexpression, nous avons montré que la protéine NCp7-eGFP surexprimée dans les cellules se localise majoritairement dans le cytoplasme et dans les nucléoles (Anton et al., 2015). Cette localisation nucléolaire de la NCp7 n'est pas suprenante. En effet ce compartiment constitue lors des infections virales une cible de plusieurs protéines virales. De nombreuses protéines de nucléocapside ont été décrites comme localisées dans le nucléole particulièrement celles du coronavirus (Dove et al., 2006a; Dove et al., 2006b; Wurm et al., 2001; You et al., 2005) des Arterivirus (Rowland et al., 1999; Tijms et al., 2002) et du virus de la dengue (Wang et al., 2002). Dans le cas du VIH-1, une modification de l'architecture nucléolaire a été observée dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH-1 (Galati et al., 2003). En outre, les protéines virales Tat et Rev ont été retrouvées dans les nucléoles. Cette localisation nucléolaire ainsi que le trafic de plusieurs transcrits viraux à travers le nucléole sont nécessaires à la réplication virale (Michienzi et al., 2000; Michienzi et al., 2006; Michienzi et al., 2002). Il a été récemment démontré que l'infection VIH-1 est associée à une diminution de l'expression des protéines nucléolaires, en particulier celles impliquées dans la biogenèse des ribosomes (Kleinman et al., 2014). L'ensemble de ces observations indique qu'il y a un lien entre la réplication du VIH-1 et le nucléole. Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à savoir si la NCp7 possède des fonctions dans ce compartiment et d'analyser l'implication fonctionnelle de cette localisation dans le cycle viral du VIH-1.

Une des voies employée pour comprendre les fonctions nucléolaires de la NCp7 est la recherche des partenaires cellulaires nucléolaires de cette protéine. Nous avons analysé plusieurs bases de données publiées récemment. Ces dernières étaient basées sur une analyse extensive des partenaires cellulaires de l'ensemble des protéines du VIH-1 (Jager et al., 2012) ou sur des études par interférence par ARN (siARN) identifiant des protéines cellulaires importantes pour une infection par le VIH-1 (Konig et al., 2008; Zhou et al., 2008). Une protéine nous a semblé particulièrement intéressante, la protéine hNoL12 (human nucleolar

proteïn 12), protéine impliquée dans la maturation des ARN ribosomiaux et mal caractérisée à ce jour. **L'objectif de la première partie de mon travail a été de caractériser l'interaction NCp7/hNoL12 en milieu cellulaire et *in vitro* par différentes techniques biochimiques et microscopiques et déterminer le rôle fonctionnel de cette interaction lors du cycle répléatif du VIH-1.**

Le travail sur cette protéine et son interaction est présenté dans la première partie de ce manuscrit et porte sur: (i) la validation de l'interaction NCp7/hNoL12 en utilisant différentes techniques (FRET-FLIM, double hybride chez la levure, co-immunoprécipitation..); (ii) la détermination du domaine de hNoL12 impliqué dans l'interaction par des expériences de co-immunoprécipitation utilisant des mutants de délétion de hNoL12; (iii) l'étude de l'implication fonctionnelle de cette interaction sur une infection par des pseudoparticules lentivirales et (iv) l'identification d'une activité 5'-3'-exoribonucléase de hNoL12.

En parallèle, j'ai travaillé sur un deuxième projet visant à étudier pour la première fois la distribution intracellulaire de la NCp7 dans un contexte viral. **L'objectif de ce projet était :** (i) l'étude de la distribution intracellulaire de la NCp7 dans les cellules infectées; (ii) l'analyse de l'association de la NCp7 avec le complexe de pré-intégration dans le cytoplasme; (iii) la caractérisation des voies d'entrée de la NCp7 dans le noyau et (iv) l'étude de son implication dans l'import nucléaire du PIC.

Pour ce faire des pseudovirus lentiviraux non répléatifs constitués de protéines NCp7 fusionnées en N- ou C-terminal à une étiquette tétracysteine (TC, séquence CCRECC) et marquées spécifiquement par un dérivé de la fluorescéine (FIAsH) ont été développés. Des analyses par imagerie confocale ont été réalisées sur des cellules HeLa infectées par ces pseudoparticules afin de suivre le devenir de la NCp7.

Je vous présente également dans une troisième partie un travail qui a débuté pendant mon stage de master 2 qui porte sur **la caractérisation de l'activité antivirale de peptides sélectionnés, *in vitro*, pour leur capacité à inhiber le rôle chaperon des ANs de la NCp7.** En effet, grâce à sa séquence hautement conservée et ses fonctions cruciales dans le cycle viral du VIH-1, la protéine NCp7 est une cible thérapeutique de choix. Des molécules dirigées contre la NC devraient être capables de compléter les trithérapies qui ciblent essentiellement les enzymes du virus. Différents types d'inhibiteurs de la NCp7 ont été développés. Les plus intéressants sont les éjecteurs de zinc qui inactivent complètement la NCp7 en éjectant les

ions zinc. Toutefois, ces molécules sont très toxiques parce qu'elles interagissent avec les protéines cellulaires contenant des doigts de zinc.

Mon travail a consisté à : (i) optimiser la vectorisation, en cellules, de peptides sélectionnés *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'activité chaperonne de la NCp7; (ii) tester leur capacité à inhiber une infection par un pseudovirus modèle des phases précoces de l'infection par le VIH-1.

III. Matériels et Méthodes

III.1. Matériels

III.1.1. Les cellules

- Cellules HeLa :

Les cellules HeLa (référence ATCC : CCL-2) sont une lignée cellulaire cancéreuse, provenant d'un prélèvement de métastases effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus : Henrietta Lacks, décédée en 1951. Ces cellules constituent la première lignée de cellules immortelles humaines jamais établie. Au laboratoire, ces cellules sont toujours utilisées avec un nombre de passages inférieur à 20.

- Cellules 293T :

Les cellules 293T (référence ATCC : CRL-3216) sont des cellules tumorales provenant de cellules embryonnaires rénales humaines. Elles expriment l'antigène grand T du virus simien SV40, permettant la réplication épisomale des plasmides portant la région de réplication SV40. Comme les cellules HeLa, on ne préférera pas les utiliser après le passage n°20.

- Les bactéries compétentes :

Les bactéries *Escherichia Coli* DH5 α sont utilisées pour les clonages (Invitrogen) et les amplifications. Elles sont cultivées en milieu LB Lysogeny Broth (tryptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, NaCl 10 g/L).

- Les levures :

Les souches de levure utilisées dans le double hybride sont : la souche AH109 (Mata *trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80DLYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3 MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*) et la souche Y187 (MaT α *Gal4 Δ Gal80 Δ ade2-101::KanR, his3, leu2-3-112, trp1-901, ura3-52 URA3::UASGAL1-LacZ, Met*).

III.1.2. Les peptides

Une solution stock concentrée (2 mg/mL) du peptide vecteur Pep1 est préparée en dissolvant 0,95 mg de Pep1 dans 500 μ L d'eau avec 1% DMSO. La solution est vortexée et soniquée dans un bain marie pendant 10 min. Une solution diluée à 2 μ M en peptide cargo (PepE ou MP72) a été préparée dans du PBS stérile. En parallèle, trois solutions diluées de Pep1 ont été préparées à des concentrations de 40, 60 et 80 μ M dans du PBS stérile, afin d'atteindre des

ratios cargo/Pep1 de 1/20, 1/30, 1/40 en final. Pour préparer les complexes, 100 μ L de la solution diluée du cargo a été ajoutée à 100 μ L de la solution du vecteur Pep1. Après avoir été mélangées doucement, les solutions de complexes sont incubées à 37°C pendant 30 min.

III.1.3. Les plasmides utilisés

Dans le **tableau 1**, l'ensemble des plasmides utilisés au cours de cette thèse sont présentés.

Nom	Insertion	Gène de résistance	Tag	Position du Tag	Promoteur	Vecteur
Les plasmides contrôles						
peGFP	eGFP	Kanamycine			CMV	
pCDNA3.1		Ampicilline			CMV	pCDNA3.1
pCI-neo		Ampicilline			CMV	pCI-neo
pActII		Ampicilline				
pcDNA3.1mRFP	mRFP	Ampicilline			CMV	pCDNA3.1
pGBKT7		Kanamycine				
Les plasmides codant la NCp7						
pFlag-NCp7	NCp7	Ampicilline	3xFlag	N-terminal	CMV	pCI-neo
pNCp7-eGFP	NCp7	Ampicilline	eGFP	C-terminal	CMV	pCDNA3.1
peGFP-NCp7	NCp7	Ampicilline	eGFP	N-terminal	CMV	
pNCp7-mCherry	NCp7	Ampicilline	mCherry	C-terminal	CMV	
pGBKT7-NCp7	NCp7	Kanamycine				pGBKT7
Les plasmides utilisés dans la production virale (a)						
pSicor-luciférase	SIN-LTR-Psi-cPPT-LoxP-CMV-Luciférase	Ampicilline			CMV	pSicor
pMD2.G	VSV-G	Ampicilline			CMV	
pCMV-dR8.91	Gag-Pol-cPPT-RRE Souche pNL4.3	Ampicilline			CMV	
Les plasmides codant la protéine hNoL12 et ses mutants						
pET-52 (b)	hNoL12	Ampicilline	10 X His	C-terminal	T7	
phNoL12-ActII	hNoL12	Ampicilline	Gal4 AD	N-terminal	pADH1	pActII
peGFP-hNoL12	hNoL12	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(1-96)	hNoL12(1-96)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(1-123)	hNoL12(1-123)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(1-176)	hNoL12(1-176)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(124-216)	hNoL12(124-216)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(97-216)	hNoL12(97-216)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(124-176)	hNoL12(124-176)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(1-61)	hNoL12(1-61)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(1-22)	hNoL12(1-22)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1

peGFP-hNoL12(22-96)	hNoL12(22-96)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(61-96)	hNoL12(61-96)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12(22-61)	hNoL12(22-61)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
peGFP-hNoL12Δ(22-61)	hNoL12Δ(22-61)	Kanamycine	eGFP	N-terminal	CMV	peGFP-C1
Les plasmides codant PepE et PepE-minus						
pcDNA3.1-PepE mRFP	PepE	Ampicilline	mRFP	C-terminal	CMV	pCDNA3.1
pcDNA3.1-Pep-minus-mRFP (c)	PepE-minus	Ampicilline	mRFP	C-terminal	CMV	pCDNA3.1

(a) Ces plasmides ont été obtenus du laboratoire de Trono (Addgene) (b) Ce plasmide provient du Dr. Marlene Oeffinger (Montréal)

III.1.4. Les anticorps primaires et secondaires utilisés

Tableau 2 A : Liste des différents anticorps primaires utilisés

Nom	Espèce	Fournisseur	Référence	Mono/Polyclonal	Application/Dilution
Anti-p24 Gag (24-4)	Souris	NIH reagent program	6521	Monoclonal	IF 1/250
Anti-hNoL12	Lapin	Bethyl lab	NP_077289.1	Polyclonal	WB 1/2000
Anti-eGFP	Souris	Proteintech	66002-1-Ig	Monoclonal	WB 1/10000
Anti-GAPDH	Souris	Millipore	MAB374	Monoclonal	WB 1/5000
Anti-Flag	Souris	Sigma	F1804	Monoclonal	WB 1/4000

Tableau 2 B : Liste des différents anticorps secondaires utilisés

Nom	Espèce	Fournisseur	Référence	Fluorophore ou Enzyme	Application/Dilution
Anti-souris HRP	Chèvre	Promega	W402B	HRP	WB 1/10000
Anti-lapin HRP	Chèvre	Promega	W401B	HRP	WB 1/10000
Anti-lapin	Chèvre	Invitrogen	A11011	Alexa fluor 568	IF 1/2000
Anti-souris	Chèvre	Invitrogen	A11031	Alexa fluor 568	IF 1/2000
Protéine A		Invitrogen	101023	HRP	WB 1/15000

III.1.5. Les oligonucléotides

Les oligonucléotides (ODNs) synthétiques ont été commandés chez Sigma Aldrich. Les séquences de ces ODNs sont présentées dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 3A et 3B**)

Tableau 3A: Les oligonucléotides utilisés pour les clonages par la technologie Gateway®

Nom du mutant	Nom du primer	Séquence (5'-3')
hNoL12 pleine longueur	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12(1-176)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12(176)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGACC

		TTTTTGCGGCTGTGTGCATG
hNoL12(1-123)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12(123)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAG CCCGAGCAGCCGG
hNoL12(1-96)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12(96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGTCTTTGCTGTCACC
hNoL12(97-213)	attB1-hNoL12(97)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGC AGTATGACCACCCCAACCACACAGTC
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12(124-213)	attB1-hNoL12(124)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGA CCCCACCTGAGGGAGGGG
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12(124-176)	attB1-hNoL12(124)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGA CCCCACCTGAGGGAGGGG
	attB2-hNoL12(176)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGACC TTTTTGCGGCTGTGTGCATG
hNoL12(1-22)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12(22)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGAAG CTAAGAACGAGCCTCGGCCG
hNoL12(1-61)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12(61)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCGA AGCTTCCTCTGCTCCTCTTTTCAG
hNoL12(22-96)	attB1-hNoL12(22)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGT TCGACGAGGAGAAGAGGCCG
	attB2-hNoL12(96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGTCTTTGCTGTCACC
hNoL12(61-96)	attB1-hNoL12(61)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATG CGGGAGGAGCGCCACCAG
	attB2-hNoL12(96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGTCTTTGCTGTCACC
hNoL12(22-61)	attB1-hNoL12(22)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGT TCGACGAGGAGAAGAGGCCG
	attB2-hNoL12(61)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCGA AGCTTCCTCTGCTCCTCTTTTCAG

Tableau 3B: Les oligonucléotides utilisés pour lesmutagenèses. Ces amorces sont phosphorylées en 5' [P]

Nom du mutant	Nom du primer	Séquence (5'-3')
pCMV-dR8.91 (NC-TC)	NC-TC Fwd	[P]GCCGGCTGCTGCCGCGAGTGCTGCGAGAGACA GGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCC
	NC-TC Rev	[P]ATTAGCCTGTCTCTCAGTACAATCTTTCATTGG
pCMV-dR8.91 (TC-NC)	TC-NC Fwd	[P]ATACAGAAAGGCAATTGCTGCCGCGAGTGCTG CGCCGGCATAACAGAAAGGCAATTTAGGAACC
	TC-NC Rev	[P]TATGGTAGCTGGATTTGTTACTTGG
pCMV-dR8.91 (IN-TC)	IN-TC Fwd	[P]GCCGGCTGCTGCCGCGAGTGCTGCTAACACATG GAATTCTGCAACAACACTGC
	IN-TC Rev	[P]ATCCTCATCCTGTCTACTTGCCACAC
hNoL12Δ (22-61)	hNoL12Δ(22-61) Fwd	[P]GAGGAGCGCCACCAGGAATACTTG
	hNoL12Δ(22-61) Rev	[P]GCTAAGAACGAGCCTCGGCCG

III.2. Méthodes

III.2.1. Biologie cellulaire

III.2.1.1. Culture cellulaire

Les cellules HeLa et 293T sont cultivées dans des flasques de 75 cm², dans du milieu de culture DMEM complet (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Gibco[®] Life Technologies réf. 21885) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Gibco[®] Life Technologies réf.10270-106) et d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline 100 UI/mL et Streptomycine 100 UI/mL). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C (5% de CO₂, 95% d'humidité). Les passages des cellules sont réalisés tous les deux ou trois jours, lorsque les cellules sont à confluence. Les cellules sont lavées une fois avec 3 mL de PBS 1X réalisé à partir d'une solution de PBS 10X (Phosphate Buffer Saline, Biowhittaker[®] Lonza, BE17-517Q), puis détachées par trypsination, avec 3 mL d'une solution de trypsine (Lonza, BE02-007E) diluée dans du PBS 1X pendant 5 min à 37°C. Elles sont reprises par 7 mL de milieu DMEM complet, afin d'arrêter l'action de la trypsine, puis centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 10 mL de DMEM complet. Après comptage des cellules dans une cellule de Mallassez, une quantité déterminée de cellules est remise en culture dans une nouvelle flasque contenant 20 mL de milieu DMEM complet (10⁶ cellules HeLa par exemple pour 3 jours de culture dans une flasque 75 cm²).

III.2.1.2. Transfection cellulaire

La transfection consiste en l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes. L'ensemble des transfactions réalisées au cours de cette thèse sont transitoires, c'est-à-dire que le matériel génétique introduit ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte. Les cellules sont transfectées par du PEI (PolyEthylèneImine), en utilisant le kit JetPEI[®] (Polyplus Transfection[™]). Ce dernier est un polymère cationique, qui permet de compacter l'ADN et de neutraliser les charges négatives du squelette phosphate de l'ADN, ainsi que de le charger positivement, entraînant une interaction avec la membrane plasmique des cellules chargée négativement. Les complexes formés sont ensuite internalisés par endocytose puis relâchés

dans le cytoplasme. Le PEI protège également l'ADN dans les endosomes en tamponnant le pH.

Les transfections des cellules sont réalisées dans des plaques de 6 ou 12 puits, dans lesquelles une quantité donnée de cellules a été ensemencée la veille. Si la transfection est réalisée dans un but d'imagerie, une lamelle en verre ronde de 18 mm de diamètre est déposée au fond de chaque puits avant l'ajout des cellules. La lamelle est stérilisée par lavage à l'éthanol 100%, puis lavée 3 fois par 2 mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite déposées dans chaque puits, et ces dernières sont placées à l'incubateur pendant 24 h.

Pour chaque échantillon, deux tubes Eppendorf sont préparés : l'un contenant l'ADN à transférer ajouté à une solution de NaCl 150 mM, l'autre contenant du PEI (solution stock à 7,5 mM) également mélangé à du NaCl 150 mM, à raison de 2 μ L de PEI pour 1 μ g d'ADN transféré. La solution de PEI est ensuite ajoutée à celle d'ADN, puis le mélange est vortexé et laissé à température ambiante pendant 20 min, de façon à permettre la formation des complexes PEI-ADN. Le contenu est enfin déposé goutte-à-goutte sur les cellules dans du DMEM complet, qui sont ensuite remises à l'incubateur. Pour toutes les transfections, la quantité d'ADN transféré est normalisée (si besoin) par ajout aux plasmides d'intérêt d'un plasmide vide.

III.2.1.3. Préparation des complexes peptides (PepE ou MP72)/Pep1

Une solution stock concentrée (2 mg/mL) du peptide vecteur Pep1 est préparée en dissolvant 0,95 mg de Pep1 dans 500 μ L d'eau avec 1% DMSO. La solution est vortexée et soniquée dans un bain marie pendant 10 min. Une solution diluée à 2 μ M en peptide cargo (PepE ou MP72) a été préparée dans du PBS stérile. En parallèle, trois solutions diluées de Pep1 ont été préparées à des concentrations de 40, 60 et 80 μ M dans du PBS stérile, afin d'atteindre des ratios cargo/Pep1 de 1/20, 1/30, 1/40 en final. Pour préparer les complexes, 100 μ L de la solution diluée du cargo a été ajoutée à 100 μ L de la solution du vecteur Pep1. Après avoir été mélangé doucement, les solutions de complexes sont incubées à 37°C pendant 30 min.

III.2.1.4. Etude de l'internalisation cellulaire des peptides par microscopie confocale et cytométrie en flux (CMF)

24 h avant l'ajout des peptides, les cellules HeLa ont été ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 2 mL de milieu DMEM complet. Pour l'imagerie

confocale, une lamelle en verre ronde de 35 mm de diamètre a été préalablement déposée au fond de chaque puits, stérilisée par ajout d'éthanol 100% et lavée trois fois par 2 mL de PBS 1X. Le jour de la transduction, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X avant l'ajout des complexes cargo/Pep1 et placées dans l'incubateur à 37°C pendant 30 min. Par la suite, 1 mL de DMEM complet a été ajouté et les cellules replacées de nouveau dans l'incubateur pour 30 min avant d'être préparées pour l'observation microscopique ou pour l'analyse par cytométrie en flux. Pour les observations microscopiques, les cellules ont été fixées avec du PFA 4%. La lamelle est ensuite montée sur une lame de verre à l'aide de milieu de montage Dapi fluoromount-G (Southern Biotech, 0100-20). Pour les analyses par cytométrie en flux, les cellules ont été préparées selon le protocole décrit dans le paragraphe suivant.

III.2.1.5. Préparation des cellules pour l'analyse par CMF

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X, trypsinées avec 500 µL de trypsine-PBS/puits pendant 3 min à 37°C et reprises dans 2 mL de DMEM complet. Après centrifugation, 2 min à 1200g, les cellules sont lavées une fois par 1 mL de PBS et fixées dans 1 mL de solution de PFA 2% dans du PBS pendant 15 min dans le noir à TA. Après deux lavages, les cellules sont comptées puis reprises dans du PBS à raison de 10⁶ cellules/mL. Les échantillons sont analysés à l'IGBMC sur un BDFACS AriaTM II. La mRFP et le Cy3 sont tous les deux excités par un laser « Yellow-Green » à 561 nm et détectés par un photomultiplicateur devant lequel sont placés des filtres optiques. On utilise un filtre dichroïque « long pass » 505 nm suivi d'un filtre « band pass » 610/20 (détectant la fluorescence entre 600 et 630 nm). L'eGFP est excitée avec un laser 488 nm et dans ce cas on utilise un filtre « long pass » 505 nm et un filtre « band pass » 525/50.

III.2.1.6. Analyse par CMF de la capacité des peptides à inhiber une infection par des lentivirus

Ces manipulations ont été réalisées dans deux conditions : i/ soit suivant l'expression des peptides par transfection transitoire, ii/ soit après leur vectorisation à l'aide de Pep1. Dans le premier cas, des cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 12 puits à raison de 3,5.10⁴ cellules par puits 24 h avant d'être transfectées par 2 µg de pcDNA3.1-Pep-plus-mRFP, pcDNA3.1-Pep-minus-mRFP ou pcDNA3.1-mRFP. Dans le second cas, 18.10⁴ cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 6 puits 24 h avant d'être traitées par les

complexes cargo/Pep1 comme décrit précédemment. 24 h post-transfection ou une heure après le contact entre les cellules et les peptides, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et infectées par le lentivecteur (par puits : 100 μ L de stock viral dans 900 μ L de DMEM complet additionné de polybrene 8 μ g/ml final). 24 h post-infection le milieu a été échangé par du DMEM complet. Les cellules ont été incubées 24 h supplémentaires avant d'être traitées pour analyse par FACS comme décrit précédemment

III.2.2. Protocoles d'imagerie cellulaire

III.2.2.1. Fixation des cellules

La fixation des cellules consiste à immobiliser les structures cellulaires, de façon à éviter toute modification de l'échantillon lors de son traitement, et à le conserver jusqu'à son utilisation. Le réactif utilisé dans notre cas est le paraformaldéhyde (PFA), qui est un polymère insoluble de formaldéhyde (CH₂)_n. Il permet de réticuler les protéines et les acides aminés en formant des ponts méthylènes. La fixation des cellules HeLa se fait en général 24 à 48 h après transfection. Elles sont lavées à deux reprises par 1 ou 2 mL de PBS 1X (en fonction du matériel utilisé lors de l'étalement des cellules : boîtes 12 ou 6 puits respectivement), puis fixées par le même volume d'une solution de PFA à 4% (solution stock à 16%, Electron Microscopy Science-15710) dans du PBS 1X pendant 15 min à température ambiante et si besoin à l'abri de la lumière. Après une série de trois lavages par du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant 20 min avec 1 mL de colorant Hoechst (Sigma-33258) dilué à une concentration de 2 μ g/mL dans du PBS 1X. Ce colorant excitable dans l'UV et émettant dans le bleu se fixe sur l'ADN et permet de visualiser les noyaux. Ensuite, les cellules sont lavées trois fois par du PBS 1X et les lamelles sont montées sur des lames de verre et mises en contact avec une goutte de milieu de montage Prolong[®] Gold antifade reagent (thermo fischer P36930), qui permet de protéger les fluorophores du phénomène de photoblanchiment. Le temps de contact des cellules avec le milieu de montage doit être au minimum de 16 heures avant observation au microscope.

III.2.2.2. Immunofluorescence

Deux types d'expériences d'immunofluorescence ont été réalisées : (i) détection de la protéine endogène hNoL12 sur des cellules HeLa transfectées par le plasmide pNCp7-eGFP et (ii) détection de la capsid p24 sur les particules virales marquées avec le dérivé de la fluorescéine FIAsh.

Dans le premier cas, des cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 12 puits, à raison de 8.10^4 cellules par puits, 24 h avant d'être transfectées par 1 μ g de plasmide pNCp7-eGFP. Les cellules sont ensuite lavées deux fois, 24 h post-transfection, par du PBS 1X, puis fixées par 1 mL de PFA 4% pendant 15 min à température ambiante, et perméabilisées avec 1 mL d'une solution de Triton-X100 1% (détergent entraînant la formation de pores dans la cellule, solution stock à 100%) dans du PBS 1X, pendant 10 min à température ambiante. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par une solution de BSA (Albumine de Sérum Bovin, Euromedex, ref 04-100-811-C) 1% dans du PBS 1X pendant 60 min. Les lamelles sont mises en contact pendant 1 h à température ambiante avec un volume de 50 μ L d'anticorps primaire anti-hNoL12 dilué à 1/250 dans de la BSA 1%, préalablement déposé sur du papier parafilm. Après une série de trois lavages avec du PBS 1X, les cellules sont mises en contact pendant 40 min à température ambiante avec 50 μ L d'anticorps secondaire anti-lapin couplé à Alexa Fluor 568 dilué à 1/1000 dans de la BSA 1%. Les lamelles sont alors montées sur des lames de verre, avec une goutte de réactif Prolong[®] Gold puis stockées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à observation.

Dans le deuxième cas, des pseudovirus WT ou NC-TC marqués au FIAsh ont été déposés sur des lamelles, préalablement traitées avec la poly-L-lysine (Sigma-P4832) (Arhel et al., 2006a). L'immunodétection de la capsid p24 a été réalisée par un anti-p24 (NIH reagent program-6521-dilution : 1/250) et a été révélée par un anti-souris couplé à Alexa fluor 568 (Invitrogen-A11031-dilution : 1/2000) en suivant le même protocole que dans le premier cas.

III.2.2.3. Microscopie confocale

Ce type de microscope permet de visualiser des protéines d'intérêt couplées à des fluorophores, qui sont excités par un laser monochromatique. La fluorescence émise peut alors provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversé par le faisceau laser. Grâce à un diaphragme variable (pinhole), ce microscope peut sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation, éliminant ainsi la fluorescence provenant des régions non focales,

contrairement au microscope à épifluorescence. Dans ce montage, le rayonnement laser est réfléchi par un miroir dichroïque, permettant de séparer la lumière d'excitation de la lumière d'émission, provenant de l'échantillon. L'objectif joue le rôle de condenseur, c'est-à-dire qu'il focalise la lumière d'excitation en un point de l'échantillon : le point focal. Les fluorophores sont alors excités et émettent des photons lors de leur retour à l'état fondamental. La fluorescence passe à nouveau par le miroir dichroïque, puis est transmise vers le photodétecteur, après passage à travers le diaphragme, élément clé du microscope. Le détecteur permet d'obtenir une coupe optique de l'échantillon, en transformant les signaux lumineux en signal numérique.

Le microscope confocal utilisé au laboratoire est à balayage laser (Leica TC SPE-II), avec un objectif G63X (HCX PL APO CS) à immersion à huile. Les raies laser d'excitation utilisées sont de longueur d'onde 405 nm (DAPI), 488 nm (eGFP) et 561 nm (mCherry). La fluorescence émise a été recueillie avec des filtres d'émission de bande passante 500-555 nm (eGFP) et 570-625 nm (mCherry).

III.2.2.4. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), est un processus dans lequel l'énergie est transférée de manière non radiative d'un fluorophore à l'état excité (donneur) à un second fluorophore (accepteur).

Ce transfert d'énergie n'est possible que si certaines conditions sont respectées. Tout d'abord, les deux fluorophores doivent se trouver à une distance inférieure à 10 nm (100Å). Cette distance est suffisamment courte, pour qu'on puisse conclure que les protéines qui portent les fluorophores soient en interaction. La dépendance du FRET en fonction de la distance est très grande puisqu'elle varie en $1/R^6$ (où R correspond à la distance entre les fluorophores). De plus, il faut que le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur se chevauchent.

Plusieurs méthodes de mesures de FRET existent, mais je me suis limitée dans ma thèse à la technique de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Cette technique permet d'acquérir une image en fonction de la durée de vie de fluorescence d'un fluorophore donné. Si les deux fluorophores (eGFP et mCherry) liés aux protéines d'intérêt sont à une distance inférieure à 10 nm, il y a un transfert d'énergie du donneur (eGFP) à l'accepteur (mCherry), qui se traduit par une diminution du temps de vie de fluorescence (τ) du donneur. Le spectre d'émission de l'eGFP est alors déplacé vers des temps de vie plus faibles (**Figure 25**).

L'efficacité du transfert d'énergie est déterminée par $(1 - \tau) / \tau_0$ où τ = temps de vie du donneur en présence de l'accepteur et τ_0 = temps de vie du donneur seul. L'efficacité permet de déterminer si deux protéines interagissent ou non. On considère que la valeur seuil est de 5%, pour qu'on puisse considérer les protéines en interaction. Le temps de vie présente l'immense avantage par rapport à l'intensité de fluorescence d'être indépendante de l'instrumentation et du niveau d'expression des protéines étudiées.

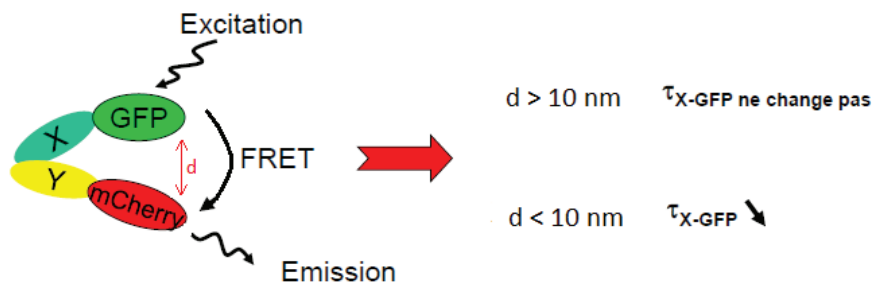


Figure 25 : Principe de la technologie FRET-FLIM. Lorsque les deux protéines d'intérêt sont à une distance de moins de 10nm, un transfert d'énergie se produit entre le donneur (eGFP) et l'accepteur (mCherry) diminuant ainsi la durée de vie de fluorescence du donneur.

Le microscope utilisé au laboratoire est un microscope à fluorescence inversé Olympus IX70 avec un objectif 60X (UPLSAPO 60XW) à immersion à eau. La fluorescence émise par l'échantillon est détectée par une photodiode à avalanche. Dans l'image finale, un déclin de fluorescence est associé à chaque pixel. Les temps de vie de fluorescence sont codés selon une échelle de couleurs, ce qui permet de reconstituer les images en temps de vie de fluorescence.

III.2.2.5. Microscopie à force atomique

Pour caractériser la taille de nos lentivecteurs, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM). Il s'agit d'une microscopie basée sur l'interaction d'une pointe nanométrique permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Ce type de microscopie est essentiellement basé sur les forces d'interactions, dites de champs proches, entre une nano particule (la partie sensible de la sonde) et la surface de l'échantillon. Cette technique a été développée afin de dépasser les limites de résolution des microscopies optiques classiques (200 nm) et ainsi obtenir une image de la surface par scans de l'échantillon avec une résolution nanométrique. Ces images peuvent être obtenues dans différentes conditions : sous vide, en phase gazeuse mais également en phase liquide (Binnig

et al., 1986). Ce dernier mode est particulièrement adapté dans le cadre d'investigations sur des objets biologiques dans des conditions proches des conditions physiologiques. L'instrument utilisé dans notre cas est un instrument commercial SOLVER Pro développé par la société Nt-MDT (Moscou). Les sondes utilisées sont des cantilevers CSG01 ayant une fréquence de résonance de 27 kHz et une constante de raideur de 0,06 N/m. Le diamètre terminal de la sonde est de l'ordre de 10 nm. L'acquisition des images se fait avec une résolution de 512 par 512 points avec une vitesse de scan de 1Hz.

III.2.3. Biochimie

III.2.3.1. Lyse des cellules

A 48 h post-transfection, les cellules sont trypsinées puis resuspendues dans 2 mL de milieu DMEM complet. Elles sont centrifugées 5 min à 1500 rpm et les culots cellulaires sont remis en suspension dans 500 µL de tampon de lyse, préparé au préalable dans la glace (H₂O, Tris-HCl 10 mM pH=7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM et NP40 1%) et auquel une tablette d'inhibiteurs de protéases a été ajoutée (Complete Mini, EDTA free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche 04693159001). Les suspensions sont conservées dans la glace pendant 20 min, avant d'être centrifugées à 14000 rpm à 4°C pendant 20 min, afin d'éliminer les débris cellulaires. Les protéines retrouvées dans le surnageant seront quantifiées par un dosage de Bradford.

III.2.3.2. Dosage de Bradford

Le dosage de Bradford est une technique de colorimétrie, permettant de quantifier les protéines d'un échantillon donné. Ce test est basé sur une modification de l'absorbance, qui se manifeste par un changement de couleur du bleu de Coomassie (constituant du Bleu de Bradford), qui se lie aux acides aminés basiques des protéines. Le réactif utilisé pour ce dosage est obtenu en diluant 2 mL de solution de réactif concentré du kit Bio-Rad Protein Assay II (Bio-Rad référence 5000002) dans 8 mL d'eau, la solution obtenue étant conservée dans la glace et à l'abri de la lumière. Une gamme étalon est préparée, avec des quantités croissantes de BSA, à partir d'une solution stock (1,44 µg/µL) diluée dans du tampon Tris (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5). Les échantillons de la gamme étalon sont tout d'abord déposés

dans une plaque 96 puits (voir tableau ci-dessous) : on réalise des duplicats, c'est-à-dire deux puits pour chaque échantillon à doser.

N° des puits	A1 + B1	A2 + B2	A3 + B3	A4 + B4	A5 + B5
Volume de réactif (µL)	200	195	190	185	180
Volume de BSA stock (µL)	0	5	10	15	20

Les échantillons de protéines à doser sont quant à eux dilués au 1/20 dans du tampon Tris. Pour chaque échantillon protéique à doser : on dépose, par puits, 190 µL de Bleu de Bradford et 10 µL d'échantillon (en duplicats également). La lecture de l'absorbance de chaque puits est réalisée à 525 nm dans un spectrophotomètre FLX-Xenius (Safras). La gamme étalon permet l'établissement d'une droite d'étalonnage d'équation $y = ax + b$ avec y et x correspondant respectivement à l'absorbance à 525 nm et à la concentration en BSA, les mesures d'absorbance étant réalisées par rapport au « blanc » de contrôle sans protéine. La concentration en protéine est obtenue en faisant la moyenne des absorbances pour chaque duplicat.

III.2.3.3. Immunoprécipitation (IP)

Un aliquote de lysat cellulaire correspondant à 90 µg de protéines est prélevé pour réaliser un dépôt « input », permettant de vérifier que les protéines désirées ont bien été surexprimées. On y ajoute du DTT (dithiothreitol) à 50 mM, pour réduire les ponts disulfures, du Bleu de Laemmli 4X (Tris-HCl 277,8 mM, glycérol 44,4 %, SDS 4,4 % et bleu de bromophénol 0,02 %), le SDS permettant d'uniformiser la charge des protéines (chargées négativement) afin de pouvoir les séparer sur la base de leur poids moléculaire, et de l'eau afin de compléter le volume à 90 µL. Les tubes « input » sont ensuite dénaturés 5 min à 95°C, puis conservés à -20°C.

Un volume équivalent à 1,5 mg de protéines est prélevé et incubé pendant 2 h sous agitation à 4°C sur une roue en présence de 1 µL d'anticorps anti-Flag. Un volume de 50 µL de suspension de billes magnétiques recouvertes de protéine A (Pure Proteome™, Protein A Magnetic Beads, Millipore, LSKMAGA10) est ajouté, puis les tubes sont remis en agitation sur roue à 4°C pendant 1 h. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon de lyse,

resuspendues dans 50 μL d'eau, de DTT et de Bleu de Laemmli comme pour les input et finalement dénaturées à 95°C et stockées à -20°C (**Figure 26**).

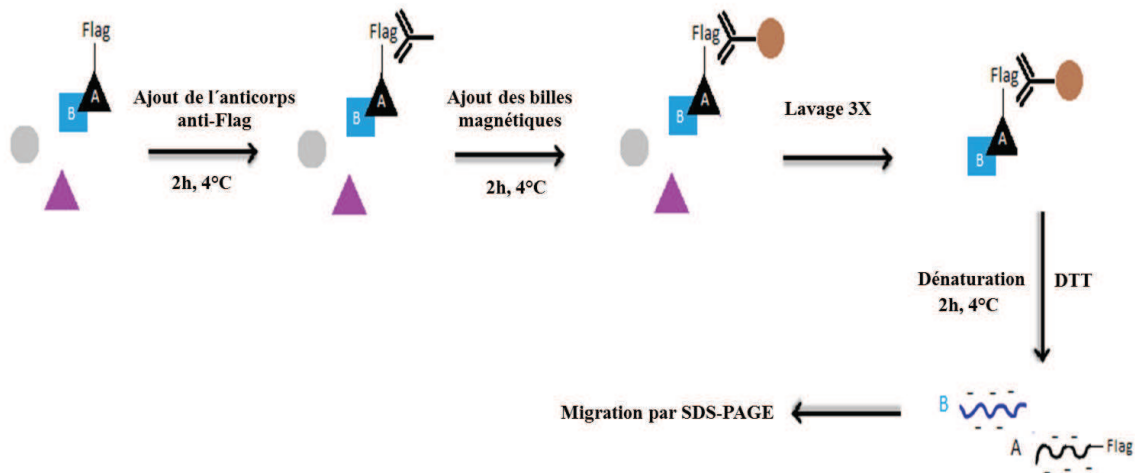


Figure 26 : Principe de la co-immunoprécipitation. Un lysat cellulaire obtenu après transfection transitoire d'un plasmide codant une protéine d'intérêt (triangle noir) fusionnée à une étiquette (Flag) est incubé avec un anticorps anti-étiquette. Des billes magnétiques recouvertes de protéine A (cercle marron) sont ajoutées, afin de fixer la partie constante de l'anticorps, ce qui permet de précipiter la protéine d'intérêt, ainsi que de co-immunoprécipiter toutes les protéines qui lui sont associées (carré bleu). Après dénaturation, les protéines sont analysées par migration dans un gel d'acrylamide SDS-PAGE.

III.2.3.4. SDS-PAGE et western blot

Les échantillons ainsi qu'un marqueur de taille (Page Ruler Plus, Thermo Fisher référence 26619) sont ensuite déposés sur deux gels d'acrylamide SDS-PAGE préparés au préalable, l'un servant par la suite à réaliser le western blot anti-Flag (immunoprécipitation), l'autre à détecter les protéines co-immunoprécipitées. Les migrations ont lieu dans du tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH = 8) pendant 2 h à 120V (système minigel Biorad). Les protéines qui ont migré sur le gel sont ensuite transférées (tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 30%, pH = 6,8) sur une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride, Amersham Hybond P référence 10600023), préalablement activée dans de l'éthanol pendant 3 min. Le transfert se fait à 110V sous agitation du tampon et dans la glace pendant 2 h. Après transfert, les membranes sont mises en contact pendant une heure en agitation et à température ambiante avec une solution de caséine 3% diluée dans du tampon TBS-T (Tris Saline Buffer-Tween, Tris 0,05 M ; NaCl 0,138 M, KCl 2,7 mM, Tween 0,2%, Sigma référence T9039), afin de bloquer les sites non spécifiques des membranes. Elles sont ensuite incubées pendant 1 h sous agitation avec une solution d'anticorps primaire dilué dans de la caséine 3%.

Après ce délai, elle est lavée trois fois pendant 10 min avec du TBS-T, puis mise en contact pendant une heure à température ambiante avec une solution d'anticorps secondaire, également dilué dans de la caséine 3%, et couplé à la protéine HRP (Horse Raddish Peroxydase). La membrane est à nouveau lavée trois fois au TBS-T pendant 10 min.

L'activité de l'enzyme HRP est révélée par le procédé ECL (Enhanced ChimioLuminescence, réactifs maison) par l'appareil ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences)

III.2.4. Production des vecteurs lentiviraux

III.2.4.1. Production virale

Les lentivirus sont produits par transfection transitoire dans des cellules 293T. 5×10^6 cellules 293T ont été ensemencées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre 24h avant la transfection. Un total de 21 μg d'ADN plasmidique a été utilisé pour la transfection d'une boîte: 3 μg de plasmide pMD2-G, 6 μg de plasmide pCMV_dR8.91, et 12 μg de vecteur de transfert pSicor-luciférase. 24h après la transfection, le milieu de culture a été changé. Les surnageants contenant les vecteurs lentiviraux ont été récoltés 48 h après la transfection, filtrés à travers des filtres de 0,45 μm d'acétate de cellulose (Millipore SLHV033RS), et concentrés deux fois par centrifugation sur des colonnes Vivaspinn ayant une capacité de filtration de 50 kDa (Sartorius Intec, référence VS2031). La concentration de l'antigène p24 viral a été déterminée par le test ELISA (Innotest® HIV Antigen mAb, InnoGenetics, Belgium référence 80563). Le stock viral est conservé dans des aliquots de 1 mL à une température de -80°C .

III.2.4.2. Marquage des lentivecteurs avec le dérivé de la fluorescéine FIAsh

Nous avons marqué les surnageants viraux (1-2 μg d'équivalent p24/mL) à température ambiante avec 0,8 μM de FIAsh EDT2 (Molecular probes T34561), 1 mM beta-mercaptoéthanol, 1 mM TCEP Tris(2-carboxyethyl)phosphine dans un volume total de 1 mL. Pour contrôler la spécificité de notre marquage, nous avons remplacé les pseudovirus NC-TC ou IN-TC par les pseudovirus WT. Après 2 h, les pseudovirus marqués ont été purifiés par ultracentrifugation à 40000 rpm pendant 30 min pour éliminer le FIAsh non lié. Les

particules virales ont été resuspendues dans 300 μL de PBS 1X (Arhel et al., 2006a; Lelek et al., 2012).

III.2.4.3. Dosage de l'activité luciférase

Pour évaluer l'infectivité de nos lentivecteurs sauvages (WT) et mutés (NC-TC, IN-TC, TC-NC), des cellules HeLa ont été mises en culture dans des plaques 6 puits, à raison de 3×10^5 cellules par puits, 24 h avant d'être infectées par du surnageant viral sauvage ou muté équivalent à 60 ng de p24 (par puits : un équivalent de 60 ng p24 dans 2 mL de DMEM additionné de polybrène 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Après 24h d'infection, les cellules ont été lavées par 2 mL de PBS 1X et lysées directement dans les puits avec 500 μL du tampon de lyse (cell culture Lysis buffer, Promega E153A supplémenté de 0.5 % Triton-X100) pendant 20 min à température ambiante. L'activité de la luciférase a été mesurée avec le kit luciferase assay system (Promega, E1500) selon le protocole du fabricant, en utilisant un luminomètre (Berthold, TriStar LB941). Brièvement, 20 μL d'échantillon est introduit dans chacun des puits d'une plaque 96 puits (plaque blanche, Greiner Bio-One reference 655 075). 70 μL de substrat de la luciférase (kit Promega E1500) est injecté et la luminescence est mesurée juste après l'addition du substrat pendant un temps d'intégration de 10s.

III.2.5. Test d'infectivité et RT-qPCR

III.2.5.1. Extinction de l'expression de la protéine hNoL12 et infection des cellules HeLa

L'extinction de l'expression de la protéine hNoL12 endogène a été effectuée par transfection transitoire de siRNA (sihNoL12). Des cellules HeLa ont été étalées dans des plaques 6 puits à une concentration de 10^5 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec soit 50 nM de siControl soit 50 nM de sihNoL12 (Dharmacon LU-015834-00-0002 et L-014330-02), en utilisant l'agent de transfection Dharmafect1 (Dharmacon, Dharmafect1, T-2001-02) selon les instructions du fabricant. 72 h post-transfection, les cellules ont été infectées par le vecteur lentiviral (par puits : un équivalent de 360 ng de p24 dans 2 mL de DMEM complet additionné de polybrène 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final). La zidovidine AZT a été utilisée comme contrôle positif dans ces expériences (par puits : AZT 1 μM dans 2 mL de DMEM complet). Après 8 h de contact avec les pseudovirus, le milieu a été changé et remplacé par du

nouveau milieu sans virus (avec AZT 1 μ M dans les puits contrôle positive) et les cellules ont été incubées jusqu'à 48 h post-infection, avant la lyse et extraction de l'ARN.

III.2.5.2. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN a été effectuée avec le kit RNeasy Mini plus (Qiagen référence 74134) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules sont lysées directement dans les puits avec 350 μ L de tampon de lyse RLT PLUS fourni avec le kit. Les lysats sont transférés dans une colonne qui permet d'éliminer l'ADN génomique (gDNA Eliminator spin column). Ensuite, un volume d'éthanol à 70% (350 μ L) est ajouté au filtrat et le mélange est chargé dans la colonne RNeasy. La colonne est lavée par 700 μ L de tampon RW1 et 500 μ L de tampon RPE. Finalement, l'ARN est élué de la colonne par 50 μ L d'eau sans RNase. La concentration des échantillons en ARN a été déterminée grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre (Nanodrop).

III.2.5.3. Reverse transcription

La reverse transcription de l'ARN en ADNc a été effectuée grâce à l'utilisation du kit iScriptTM Select cDNA Synthesis (Bio-Rad référence 1708896). La réaction est effectuée dans un volume total de 20 μ L contenant : 1 μ g d'ARN total, 4 μ L de 5X RT reaction mix, 1 μ L de transcriptase inverse iScript, et le volume final est complété à 20 μ L avec de l'eau sans nucléases. Le mix est incubé pendant 5 min à 25°C, 30 min à 42°C puis 5 min à 85°C dans un thermocycleur Biorad T100.

III.2.5.4. PCR quantitative (qPCR)

Les réactions de qPCR ont été réalisées en utilisant le kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, 4385612). Chaque mélange réactionnel contient 300 nM de chacune des amorces forward et reverse, 50 ng d'ADNc, et 10 μ L de 2X Fast SYBR® Green Master Mix dans un volume réactionnel total de 20 μ L.

Les réactions sont préparées dans une plaque 96 puits (MicroAmp®, Applied Biosystems, 4346907). Ensuite, la plaque est scellée avec un film adhésif, centrifugée à 1600 rpm pendant 3 min et placée dans un ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Pour l'amplification, nous avons utilisé le programme suivant : 95°C pendant 20 s et 40 cycles de

95°C pendant 3 s et 60°C pendant 30 s. La quantité d'ARNm codant la luciférase est normalisée sur celle de l'ARN ribosomal 18S.

Les quantités relatives d'ADNc dans les différents échantillons ont été estimées par la méthode de calcul des $\Delta\Delta Ct$. Pour obtenir une valeur relative du taux d'expression du gène d'intérêt dans un échantillon de référence, la quantité du gène cible est d'abord normalisée par rapport à un gène de référence (18S). Une valeur ΔCt test obtenue pour chaque échantillon dont un échantillon est défini comme calibrateur. Ensuite, pour chaque échantillon, la valeur du ΔCt est comparée à la valeur du ΔCt obtenue pour l'échantillon calibrateur : une valeur de $\Delta\Delta Ct$ est ainsi obtenue. Dans chaque échantillon, la quantification relative (QR) du gène cible par rapport à l'échantillon de référence est donnée par la formule $QR=2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les amorces utilisées au cours de l'amplification sont les suivantes:

Luciférase : Forward: 5'-TGAGTACTTCGAAATGTCCGTTC-3'

Reverse: 5'-GTATTCAGCCCATATCGTTTCAT-3'

ARN ribosomal 18S: Forward: 5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3'

Reverse: 5'-TCCAGACCATTGGCTAGGAC-3'

III.2.6. Purification de la protéine hNoL12

Des bactéries E. coli BL21 (DE3) pLysS transformées par le vecteur pET52 codant la protéine hNoL12 fusionnée en C-terminal à une étiquette Histidine ont été cultivées dans du milieu LB (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7) contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 25 µg/mL de chloramphenicol. La production de protéines recombinantes a été réalisée en inoculant une seule colonie dans 50 mL de milieu LB contenant des antibiotiques à 37°C, pendant 12 h sous agitation à 200 rpm. Cette culture a été utilisée pour inoculer 1 L de milieu LB contenant des antibiotiques. La culture a été menée à 37°C sous agitation à 200 rpm, jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,6. La température a alors été réduite à 30°C pendant 20 min et, afin d'induire l'expression de la protéine, de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) a été ajouté à une concentration finale de 1 mM. La croissance des bactéries a été poursuivie pendant 4 h après lesquelles les bactéries ont été récoltées par centrifugation, congelées rapidement dans de l'azote liquide et stockées à -80°C. Les bactéries ont été décongelées sur la glace et lysées par sonication (IKASONIC U50, 5 sonications successives d'1 min chacune dans 35 mL du tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 1M; Triton-X100 0,05% et une tablette d'inhibiteurs de protéases) à 4°C. Le lysat a

été clarifié par centrifugation à 15000 rpm pendant 60 min à 4°C puis chargé sur une colonne de nickel (25 mL, Ni-NTA agarose column, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; MgCl₂ 5 mM; DTT 1 mM). La protéine a été éluée dans le tampon B (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; MgCl₂ 5 mM, imidazole 500 mM; DTT 1 mM) avec un gradient linéaire d'imidazole de 5 à 500 mM. Les fractions éluées ont été analysées par SDS-PAGE, visualisées par coloration au Bleu de Coomassie et les fractions contenant hNoL12 ont été regroupées et dialysées pendant la nuit contre le tampon A. La protéine dialysée a été chargée sur une colonne échangeuse de cations (25 mL DEAE sepharose fast flow ion exchange, GE Healthcare) équilibrée au préalable avec du tampon A. La protéine a été éluée dans du tampon C (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 2 M; MgCl₂ 5 mM) avec un gradient linéaire de NaCl de 0,25 M à 2M. Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été identifiées par SDS-PAGE, rassemblées et concentrées sur des filtres à centrifuger (Centricon 10kDa filtres, Millipore UFC701008). La concentration finale en protéine a été déterminée par spectroscopie en mesurant l'absorbance à 280 nm (coefficient d'extinction molaire 4470 M⁻¹ cm⁻¹). 5% de glycérol sont ajoutés à la solution de protéine avant de l'aliquoter et de la congeler rapidement dans de l'azote liquide afin d'éviter son agrégation. La protéine est ensuite conservée à -80°C.

III.2.7. Synthèse peptidique

Le peptide E (PepE) marqué avec de la cyanine3 a été synthétisé en phase solide sur un synthétiseur de peptide 433A (ABI, Foster City, CA). La synthèse a été réalisée à une échelle de 0,1 mmol en utilisant une stratégie Fmoc ; la synthèse s'effectue de façon itérative avec un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyl (N-Fmoc) et un protocole de couplage de type HBTU/HOBT. La résine utilisée comme support solide est de type « Rink Amide AM » (Activotec) avec un taux de marquage de 0,71 mmol/g en espèces réactives. Un espaceur β-alanine a été ajouté en position N-terminale du peptide avant d'insérer le fluorophore cyanine3 (Cy3). Ensuite, 0,05 mmol de résine a été isolé et suspendu dans 1 mL de N-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP) contenant 0,05 mmol de Cyanine 3 sous forme d'ester de succinimide (Lumiprobe, 1 équ., 36,79 mg) et 100 μL de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) pendant une nuit à température ambiante. Après filtration et lavage avec du méthanol et du dichlorométhane, la peptidyl-résine a été clivée pendant 2 h à l'aide d'un mélange contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) en présence de tri(isopropyl)silane (5%, v/v) et d'eau (2,5%, v/v) . Le peptide a ensuite été précipité par de l'éther diéthylique froid puis récolté par

centrifugation. Sa purification a été réalisée par Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase inverse à l'aide d'une colonne C18 (Nucleosil, 100 Å, 5 µm, 250 x 10, Macherey-Nagel, France) en utilisant un mélange eau/acétonitrile contenant 0,05% de TFA avec un gradient linéaire (30 à 80% d'acétonitrile pendant 90 min) avec une détection à 220 nm. Le poids moléculaire du peptide a été déterminé par spectrométrie de masse ($m/z = 2527,5$) en accord avec la masse théorique attendue. Avant utilisation, le peptide a été solubilisé dans de l'eau de qualité MilliQ, aliquoté et conservé à -20°C . La concentration du peptide E marqué a été déterminée à partir de l'absorbance du Cy3 à 550 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III.2.8. Biologie moléculaire

III.2.8.1. Transformation de bactéries compétentes et purification de l'ADN plasmidique

Après décongélation lente de 50 µL de bactéries compétentes *E.coli* DH5α dans la glace, ces dernières sont incubées pendant 10 min sur glace avec le plasmide d'intérêt. Le tube contenant le mélange est ensuite placé à 42°C pendant 45 s, puis immédiatement retransféré dans la glace pendant 10 min. Le choc thermique (passage de 0°C à 42°C) accroît la perméabilité de la membrane bactérienne, ce qui favorise la pénétration du plasmide dans la bactérie. Les bactéries sont remises en suspension dans 1 mL de milieu LB sans antibiotiques et incubées 1 h à 37°C sous agitation, étape importante durant laquelle la paroi se reconstitue et les gènes de résistance aux antibiotiques sont exprimés. Finalement, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar (agar : 15 g/L–Difco™ LB agar, Lennox) ainsi que l'antibiotique dont le plasmide d'intérêt possède le gène de résistance (ampicilline 100 µg/mL ; kanamycine et gentamycine, 50 µg/mL) et placées à 37°C pendant la nuit.

Le second jour, une des colonies ayant poussé sur le milieu de culture estensemencée dans 5 mL de milieu LB (préculture) possédant l'antibiotique adéquat et mise en culture sur la journée à 37°C sous agitation à 200 rpm. Le soir, cette préculture est utilisée pour ensemenecer 150 mL de milieu LB contenant l'antibiotique qui sont mis en culture à 37°C durant 14 à 16 h. La purification de l'ADN plasmidique est réalisée sur des colonnes échangeuses d'anion

grâce au kit Nucléobond Xtra Midi Plus® (Macherey-Nagel) et la lecture des concentrations d'ADN est effectuée par un spectrophotomètre de type nanodrop.

III.2.8.2. Clonage Gateway

Pour obtenir les mutants de délétion de la protéine hNoL12, nous avons utilisé la technologie de clonage de type Gateway, les amorces utilisées dans ce clonage sont représentées dans le **Tableau 3A**. La technologie Gateway (Invitrogen) permet de cloner facilement un gène d'intérêt dans divers vecteurs par recombinaison.

La technologie Gateway est basée sur la capacité du phage lambda à intégrer son génome viral dans celui d'*E.Coli* par recombinaison. Le système est basé sur deux réactions de recombinaison. Par PCR, les extrémités 5' et 3' du cDNA d'intérêt sont flanquées de sites spécifiques d'attachement (attB) permettant son intégration par recombinaison dans un plasmide intermédiaire (pDONOR207) qui porte les sites attP complémentaires flanquant le gène *ccdB* codant une protéine inhibant la croissance des bactéries DH5α (réaction BP, **Figure 27 A**). Le remplacement du gène inhibiteur par le gène d'intérêt permet la sélection de bactéries transformées par le vecteur d'entrée. Cette réaction est catalysée par la BP Clonase™ enzyme mix (composée d'intégrase et de facteur d'intégration IHF). Le vecteur d'entrée, dont la séquence est vérifiée par séquençage, est utilisé pour la seconde réaction de recombinaison : la réaction LR (**Figure 27 B**). Elle permet la recombinaison d'un substrat flanqué des séquences attL (vecteur d'entrée) avec un vecteur de destination flanqué des séquences attR. Cette réaction catalysée par la LR Clonase™ (composée d'intégrase, d'excisionase Xis et de facteur d'intégration IHF).

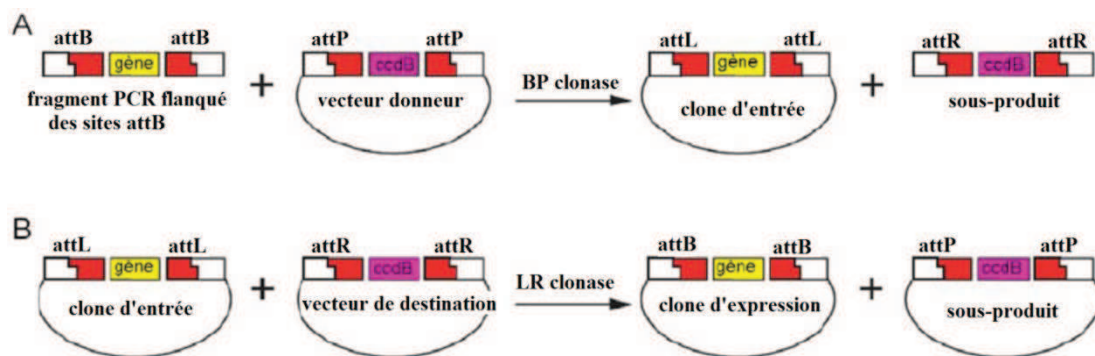


Figure 27 : Principe de la technologie Gateway. Schéma des deux étapes nécessaire au clonage Gateway. Les deux réactions BP (A) et LR (B) sont décrites dans le texte.

III.2.8.3. Mutagenèse

Pour générer les mutants du plasmide pCMV_dR8.91 utilisés dans la production des lentivecteurs mutés (NC-TC, TC-NC and IN-TC) et le mutant peGFP-NoL12Δ(22-61), nous avons utilisé le « Site Directed Mutagenesis Kit » (Thermo scientific, F-541) suivant un protocole qui comporte 3 étapes :

- La première étape consiste en une réaction de PCR (**Tableau 4**) amplifiant l'intégralité du plasmide à muter avec des amorces phosphorylées en 5'. Les amorces utilisées dans ce clonage sont représentées dans le **Tableau 3B**.
- Une étape de circularisation du plasmide muté, obtenu par PCR, par la T4 ADN quick ligase.
- La transformation de l'ADN circularisé dans des bactéries ultracompétentes NEB DH5α, puis la vérification de la présence de la mutation ou délétion désirée par séquençage du plasmide.

Tableau 4: Mélange réalisé pour la réaction de mutagenèse

Composant	Volume (μL)	Concentration finale
H2O	Qsp 50 μL	
Tampon 5x Phusion HF	10 μL	1x
10Mm dNTPs	1 μL	200 μM chacun
Amorce A	2,5 μL	10 μM
Amorce B	2,5 μL	10 μM
ADN à muter	x μL	1 ng
ADN polymérase Phusion Hot Start (2U/μL)	0,5 μL	0,02 U/μL

III.2.8.4. Double hybride chez la levure

Le système du double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* permet d'identifier une interaction protéine-protéine (X-Y) *in vivo* par reconstitution du facteur de transcription de levure Gal4. Le facteur Gal4 est formé d'un domaine de liaison à l'ADN (DLA) et d'un domaine d'activation (DA) qui, lorsque séparés, ne sont pas capables d'interagir et d'activer

la transcription. Par contre un facteur Gal4 actif peut être reconstitué par la fusion de DLA et DA à deux protéines qui interagissent entre elles.

Dans cette technique, les deux protéines d'intérêt X et Y sont fusionnées aux deux sous-domaines de Gal4 et ciblées dans le noyau de la levure. Si X et Y interagissent, le facteur de transcription Gal4 est reconstitué et la transcription d'un gène rapporteur, inséré dans le génome de la levure et placé sous le contrôle de Gal4 sera observé. A l'inverse, si les protéines n'interagissent pas, le facteur de transcription sera inactif et le gène rapporteur ne sera pas transcrit. Dans notre cas, le gène rapporteur est celui de l'histidine. Pour cela, les ADNc codants hNoL12 et NCp7 ont été clonés dans les vecteurs pActII (codant le domaine d'activation de Gal4) et pGBKT7 (codant le domaine de liaison à l'ADN de Gal4), respectivement. Les constructions pActII ont été transformées par la méthode de Li/Ac dans des levures *Saccharomyces Cerevisiae* de souche AH109 et les constructions pGBKT7 dans les levures de souches Y187.

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

Plusieurs clones indépendants de chaque diploïde ont été prélevés et déposés sur un milieu – Leu/-Trp/-His pour sélectionner les interactants positifs.

III.2.9. Biophysique

III.2.9.1. Anisotropie de fluorescence

Nous avons étudié la liaison de hNoL12 à l'ARN par anisotropie de fluorescence dont le principe est expliqué ci-dessous.

Principe et appareillage : Lorsqu'on illumine une population de fluorophores en solution par une lumière polarisée (c'est-à-dire caractérisée par un champ électrique qui vibre dans une direction unique), ceux dont les moments dipolaires de transition d'absorption μ_A sont orientés dans une direction proche de celle du vecteur champ électrique du faisceau incident sont préférentiellement excités. C'est le phénomène de photosélection. La fluorescence émise est orientée selon un vecteur champ électrique parallèle à la direction du moment dipolaire de transition d'émission μ_E qui caractérise la molécule fluorescente dans son état excité. Comme

la distribution des molécules à l'état excité est anisotrope, du fait de la photosélection, il en résulte une lumière de fluorescence polarisée, en fonction de l'orientation des molécules excitées au moment de l'émission.

Ce phénomène peut être quantifié par l'anisotropie de fluorescence r . Les mesures d'anisotropie donnent des informations sur la mobilité, la taille, la forme et la flexibilité des molécules. Plus le mouvement d'une molécule est rapide, plus la lumière est dépolarisée et par conséquent l'anisotropie sera faible. L'anisotropie de fluorescence peut être calculée en mesurant les intensités de fluorescence résultant d'une excitation polarisée avec un polariseur d'émission alternativement orienté parallèlement ($I_{//}$) et perpendiculairement (I_{\perp}) au vecteur électrique de la lumière d'excitation. L'anisotropie r peut alors être déterminée par la formule suivante:

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$$

Les mesures d'anisotropie ont été réalisées à 20°C à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog (Jobin Yvon Horiba) dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5, KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 10 mM. Une concentration fixe de 60 nM d'oligonucléotide (ODN) marqué en 5' avec du TAMRA (5'Tamra-CAGCAGUACAAAUGGCAGAUUC-3') a été titrée par une concentration croissante de hNoL12 purifiée. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du TAMRA ont été fixées à 520 et 580 nm, respectivement.

III.2.9.2. Spectroscopie de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog (Jobin Yvon Horiba) équipé d'un porte cuve thermostaté. La source d'excitation est une lampe à xenon. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont sélectionnées par deux monochromateurs 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.

III.2.9.3. Test exonucléase basé sur la fluorescence de la 2-aminopurine

Afin d'étudier l'activité exonucléase de la protéine hNoL12, nous avons développé un test exonucléase basé sur la fluorescence de la 2-aminopurine (2AP). La 2AP est un analogue fluorescent de l'adénine formant des appariements stables avec la thymine, et des bases mesappariées avec la cytosine, l'adénine et la guanine. Elle peut être incorporée dans une séquence d'acides nucléiques à la place d'une base naturelle et y jouer le rôle de rapporteur fluorescent. La 2AP est sensible à son microenvironnement et donne par conséquent des informations locales au sein d'un acide nucléique. Au sein des oligonucléotides, la fluorescence de la 2AP étant partiellement éteinte, les changements de conformation locaux induits par la liaison de la protéine hNoL12 et la dégradation par l'activité exonucléase se traduisent par une augmentation de la fluorescence de la 2AP (augmentation du rendement quantique).

Les mesures ont été effectuées dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,5, de KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 10 mM (Oeffinger et al., 2009) avec 3 μM d'oligonucléotides marqués en troisième position du côté 5' avec la 2AP (5'-UCXCGGCUAGCUGUGAAAGGCCGUGA-3') et 3 μM de protéine hNoL12 à 37°C en utilisant le Fluorolog (Jobin Yvon Horiba). La 2AP a été excitée sélectivement avec une longueur d'onde de 315 nm. Le maximum d'émission a été fixé à 375 nm.

IV. Résultats

IV.1.

Caractérisation de l'interaction entre la protéine virale NCp7 et son partenaire cellulaire hNoL12

IV.1.1. Introduction

Recherche des partenaires cellulaires de NCp7

Du fait de son implication fonctionnelle multiple ainsi que de la forte conservation de sa séquence entre différentes souches virales, nous nous intéressons, au laboratoire, à la protéine NCp7 comme cible thérapeutique de nouveaux antirétroviraux. Nous cherchons donc à analyser les mécanismes moléculaires dans lesquels cette protéine est impliquée au cours de l'infection virale. Une des voies employées est la recherche de partenaires cellulaires de NCp7.

Afin d'identifier des partenaires spécifiques de NCp7, nous avons analysé plusieurs bases de données publiées récemment portant, soit sur l'identification des protéines cellulaires associées à chacune des protéines du VIH-1 (Jager et al., 2012), soit sur des études à l'échelle du génome cherchant à identifier par ARN interférent (siRNA) des protéines cellulaires impliquées dans l'infection par le VIH-1 (Zhou et al., 2008). Jäger et ses collègues ont effectué une purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse pour chercher des interactions physiques entre les protéines de VIH-1 (y compris NCp7 et Gag) et les protéines cellulaires dans deux lignées cellulaires différentes (HEK293 et Jurkat). Ils ont utilisé un système de « scoring » qui a permis d'identifier, pour chaque protéine virale, les partenaires cellulaires les plus probables. La protéine hNoL12 était parmi les protéines cellulaires interagissant avec NCp7 et n'a pas été trouvée associée à Gag. Nous avons choisi cette protéine pour notre étude.

NoL12 humain (Unigene : 79159), également appelée Nop25 chez le rat (Unigene : 362955), est une protéine ubiquitaire qui possède plusieurs orthologues chez les mammifères mais aussi la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rrp17p, Unigene : 852021) et la drosophile *melanogaster* (viriato, gene ID : 326214).

Il faut noter qu'il y a peu de publications sur la protéine hNoL12 et ses homologues. Je vous présente par la suite les informations qui existent dans la littérature pour chaque protéine (Nop25, Rrp17p et hNoL12).

La protéine Nop25

Une première étude réalisée par Suzuki et al a permis de cloner et de caractériser la protéine Nop25. Selon cette étude, Nop25 est une protéine de 216 a.a., avec un poids moléculaire de

25 kDa, exprimée dans divers organes et présente en permanence au cours de l'embryogenèse. Nop25 est principalement localisée dans le noyau et plus précisément dans les nucléoles. Cette localisation a été montrée comme dépendante de la transcription des ARNs ribosomiaux. Cette étude montre également que Nop25 est une protéine de liaison aux ARNs en général et plus particulièrement à l'ARN ribosomal 28S (Suzuki et al., 2006).

Une deuxième publication sur la protéine Nop25 a montré que cette dernière possède plusieurs domaines de localisation nucléaires et nucléolaires. Dans cette étude les auteurs ont construit différents mutants de délétion de la protéine Nop25 fusionnés à l'eGFP et ces mutants ont été exprimés dans les cellules COS7. La délétion des 70 a.a. N-terminaux (Nop25 Δ N70) n'a aucun effet sur la localisation nucléolaire. Contrairement à cette délétion N-terminale, une protéine Nop25 délétée des 60 a.a. C-terminaux (Nop25 Δ C60) a montré une perte de la localisation nucléolaire tout en restant localisée dans le noyau. En cas de double délétion (en N- et C-terminal, Nop25 Δ NC), la protéine perd à la fois ses localisations nucléolaire et nucléaire. En conclusion, ces résultats suggèrent qu'une séquence de ciblage nucléaire et une autre nucléolaire de Nop25 sont localisées en C-terminal alors que l'extrémité N-terminale pourrait porter une seconde séquence de ciblage nucléaire. Afin de localiser plus précisément la séquence de localisation nucléolaire dans la région C-terminale, des peptides dérivant de la séquence C-terminale (Nop25C62) en fusion à l'eGFP ont été construits. Les études de localisation cellulaire de ces peptides suggèrent qu'un peptide P8 riche en a.a. basiques (a.a. 178-206 de Nop25) est la séquence la plus importante de ciblage nucléolaire et sa richesse en acides aminés basiques pourrait jouer un rôle important dans la localisation nucléolaire de Nop25. Cette séquence jouerait également un rôle important dans la liaison de Nop25 aux ARN, interaction essentielle pour la localisation nucléolaire de cette protéine (**Figure 28**) (Fujiwara et al., 2006).

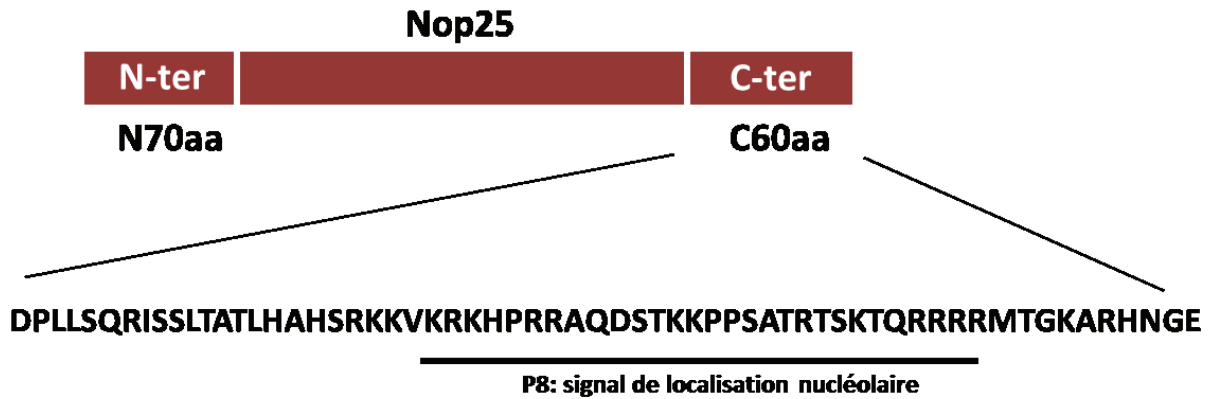


Figure 28: Représentation schématique de la protéine Nop25. Une séquence de 70 acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale serait impliquée dans le ciblage de Nop25 dans le noyau (Nop25 Δ C60), alors que la séquence de ciblage au nucléole serait localisée au niveau de l'extrémité C-terminale (Nop25 Δ N70). La localisation nucléolaire de Nop25 serait due à une séquence retrouvée au niveau de l'extrémité C-terminale. La séquence la plus probable serait le peptide P8, riche en résidus basiques tels que l'arginine ou la lysine. Cette séquence jouerait un rôle important dans la liaison de Nop25 à l'ARN.

Bien que le rôle de la protéine Nop25 dans les nucléoles n'ait pas encore été clairement défini, des études ont cependant pu mettre en évidence son importance dans l'agencement et le maintien de l'architecture nucléolaire. En effet, la surexpression du fragment N-terminal (N70) induit la fragmentation des nucléoles et la dispersion des protéines nucléolaires, comme la nucléophosmine, dans le nucléoplasme. De la même manière, le knock-down de l'expression de la protéine Nop25 dans des cellules HeLa entraîne une fragmentation du nucléole (Suzuki et al., 2007).

La protéine Rrp17p

Les informations disponibles sur la protéine Rrp17p proviennent d'une étude effectuée chez la levure *S. cerevisiae*. Selon cette étude, Rrp17p est une protéine de 28kDa riche en a.a. basiques. Elle est impliquée dans la maturation de l'ARNr de la sous unité 60S notamment dans la maturation des ARNr 5,8S et 25S. Cette protéine possède une activité 5'-3'-exoribonucléase Mg²⁺ dépendante qui est sensible à la modification de l'extrémité 5' de l'ARN (phosphorylation, coiffe..). Le domaine catalytique est situé sur son extrémité N-terminale. Le knock-out de Rrp17p est létal pour la levure soulignant l'importance fonctionnelle de cette protéine. De manière intéressante, la protéine hNoL12 est capable de suppléer à l'absence de Rrp17p suggérant que hNoL12 et Rrp17p possèdent des fonctions communes *in vivo*. Cette protéine aurait également, chez la levure, un rôle dans la liaison aux pré-ribosomes 60S (Sahasranaman et al., 2011), et dans leur migration des nucléoles vers la

périphérie du noyau, avant leur export dans le cytoplasme, couplant alors maturation des ARNs ribosomiaux et export nucléaire (Oeffinger et al., 2009).

La protéine hNoL12

La protéine hNoL12 est composée de 213 a.a. (25kDa). Elle est capable de se lier aux ARNs et est localisée majoritairement dans les nucléoles. La plupart des données fonctionnelles sur la protéine hNoL12 sont déduites à partir de celles de son orthologue de levure *S. cerevisiae*.

Lors de la synthèse des ribosomes, la transcription de l'ADN ribosomique, première étape de la biogenèse des ribosomes, produit un long précurseur polycistronique de 47S (pre-ARNr 47S) (**Figure 29A**) (Moss and Stefanovsky, 1995). Après des séries de clivages, ce précurseur 47S génère les futurs ARN ribosomiaux (ARNr) matures 5.8S et 28S (composants de la grande sous-unité 60S du ribosome) et le futur ARNr mature 18S (constituant de la petite sous-unité 40S) (**Figure 29B**) (Henras et al., 2015; Nazar, 2004; Sloan et al., 2013). Sloan et al (Sloan et al., 2013) ont montré que la déplétion de hNoL12 entraîne une altération dans la production des ARNr 18S, 5.8S et 28S ce qui indique un blocage de maturation de ITS1 (espaceurs transcrits internes, voir **Figure 29A**). La déplétion de hNoL12 est également associée à une augmentation de la quantité des précurseurs 47/45S, 41S, 36S. Par contre la quantité des précurseurs 32S, 30S, 21S, 12S et 18SE est significativement diminuée indiquant que le clivage au niveau des sites 2a et 2 a été sévèrement affecté. Ces clivages sont ceux qui génèrent le passage des formes 45, 43, 41 et 36S vers les formes de plus petites tailles (**Figure 29**).

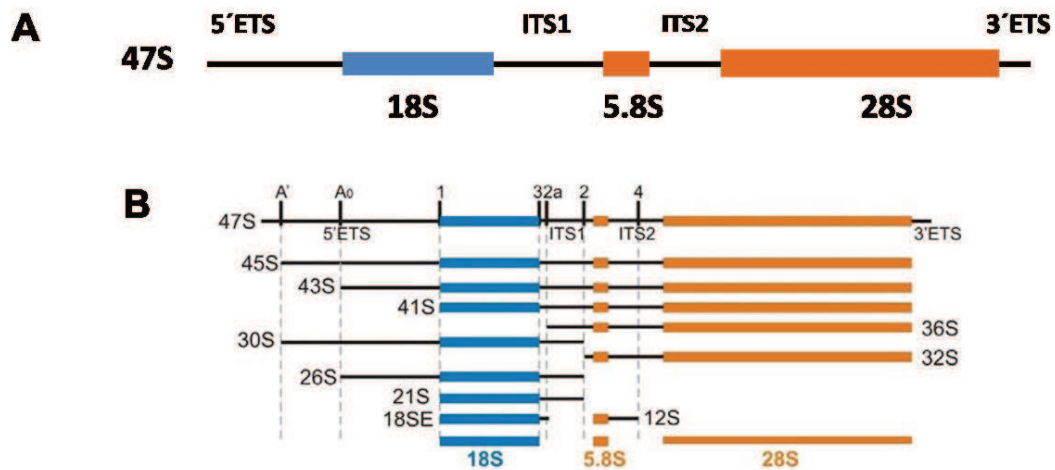


Figure 29: Maturation du précurseur polycistronique pre-ARNr 47S. (A) Représentation schématique du précurseur 47S contenant les ARN ribosomaux 18S, 5.8S et 28S. Ce précurseur contient également l'espaceur transcrit externe en 5' (5'ETS) puis les deux espaceurs transcrits internes (ITS1 et ITS2), localisés respectivement entre 18S et 5.8S et entre 5.8S et 28S, et enfin l'espaceur transcrit externe en 3' (3'ETS) (B) Représentation schématique de la maturation du précurseur 47S avec les sites de clivages au sein des espaceurs transcrits. La séquence des clivages au sein des ITS ou ETS conduit à la formation de nombreux intermédiaires nucléotidiques pour aboutir finalement à la production des ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Adaptée de (Sloan et al., 2013).

L'objectif de cette première partie du travail a été de valider l'interaction entre NCp7 et hNoL12, de déterminer le domaine de hNoL12 impliqué dans l'interaction et d'étudier l'implication fonctionnelle de cette interaction sur le cycle viral du VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la validation de l'interaction par différentes techniques (FRET-FLIM, co-IP, double hybride chez *S. cerevisiae*). Par la suite, nous avons construit des mutants de délétion de la protéine hNoL12, ces mutants ont été testés pour leur interaction avec la protéine Flag-NCp7. Nos résultats ont montré que l'interaction NCp7/hNoL12 se fait via le domaine exonucléase de la protéine hNoL12 (a.a. 22 à 61).

Afin d'étudier l'effet de la protéine hNoL12 sur les phases précoces du cycle viral du VIH-1, nous avons utilisé des pseudoparticules lentivirales non répliquatives pseudotypées par la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). L'implication fonctionnelle de hNoL12 dans les phases précoces de l'infection est soulignée par la diminution significative de l'infection par le vecteur lentiviral lors de l'extinction de l'expression de hNoL12 par des siRNA. Après avoir établi un effet de hNoL12 dans les phases précoces de l'infection, nous nous sommes intéressés à l'effet de la NCp7 sur l'activité exonucléase de hNoL12. Dans un premier temps, nous avons purifié la protéine hNoL12 exprimée en bactérie et nous avons mis au point un test *in vitro* de mesure de l'activité exonucléase basé sur la fluorescence de la 2-

aminopurine introduite dans l'acide nucléique cible. Pour la première fois, nous avons montré que hNoL12, comme son orthologue Rrp17p, présente une activité 5'-3'-exoribonucléase. Ces travaux sont présentés sous forme d'un manuscrit (article) pour publication en 2016.

IV.1.2. Manuscrit

Interaction of the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 with the cellular protein hNoL12: Molecular and functional aspects

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) nucleocapsid protein NCp7 is a nucleic acid (NA) chaperone protein with two highly conserved zinc fingers. The key roles of NCp7 in the viral cycle likely involve also interactions with host proteins. The human NoL12 protein (hNoL12) was identified as a potential target of NCp7. hNoL12 is a highly conserved 25 kDa nucleolar RNA-binding protein which is implicated in the 5'-end processing of ribosomal RNA (rRNA) in the nucleolus and thus, in the assembly and maturation of ribosomes. In this work, we showed for the first time that hNoL12 is a 5'-to-3' exonuclease specific of ssRNA. Moreover, we confirmed the NCp7/hNoL12 interaction in the nucleoli by Förster resonance energy transfer (FRET) visualized by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). The interaction between the two proteins was further confirmed by co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid assay. Using deletion mutants of hNoL12, we found that the binding domain for NCp7 was located on the exonuclease domain of hNoL12. Finally, the functional involvement of the NCp7/hNoL12 interaction was highlighted by the fact that a knockdown of hNoL12 in HeLa cells led to a decrease in cell infection by a non-replicative lentivirus model of the early phase of an HIV-1 infection.

Introduction

The human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) nucleocapsid protein (NCp7) is a small basic structural protein resulting from the cleavage of the polyprotein Gag by the viral protease during the maturation of the virus particles. The mature NCp7 is composed of 55 amino acids (a.a.) with two highly conserved CCHC type zinc fingers (ZF) bridged by a small basic linker and flanked by unfolded N- and C-terminal basic domains (Lee et al., 1998; Morellet et al., 1992). NCp7 exhibits nucleic acid (NA) chaperone activity that relies on the formation of a hydrophobic plateau at the top of the two correctly folded ZF (Clever et al., 1995; Clever et al., 2002; Darlix et al., 2011). The capacity of NCp7 to drive its specific targets towards their most thermodynamically stable conformation makes it a central player in several steps of the viral life cycle. In the early phase, NCp7 was shown to cover the incoming genomic RNA

protecting it from cellular nucleases (Darlix et al., 2007; Darlix et al., 1995; Thomas and Gorelick, 2008). More specifically, NCp7 regulates the efficiency and fidelity of primer tRNA annealing to the Primer Binding Site on the gRNA and the two obligatory strand transfers during viral reverse transcription (Darlix et al., 2011). Moreover, NCp7 is thought to stimulate the viral integration into the host cell genome in the nucleus (Carteau et al., 1999; Darlix et al., 2011; Thomas et al., 2006). In the late phase of infection, NCp7 is found as a domain of the polyprotein Gag and binds specifically to the genomic encapsidation signal (ψ) of the viral RNA, leading to its selective encapsidation into budding virions (Dannull et al., 1994).

Among all the functions attributed to NCp7, the role of this protein in the nucleus of the infected cell is still poorly understood. In fact, the incoming NCp7 was detected as soon as 8 hours post infection (p.i.) in the nucleolar fraction of CD4-positive HeLa-P4 infected cells (Gallay et al., 1995). It was also revealed by immunofluorescence at 10 hours p.i. in the nucleus of lymphoblastic H9 cells in which it accumulates till 18 hours p.i. (Zhang and Crumpacker, 2002). Interestingly, after transient overexpression, NCp7 fused to eGFP, mCherry or other fluorescent proteins is found distributed all over the cell with a high concentration in the nucleoli. It is also the case when NCp7 is revealed by immunofluorescence after cellular transfection with a plasmid coding for NCp7 or after an infection. The association of NCp7 and the nucleoli was further confirmed in recent studies which additionally showed, using a combination of advanced quantitative fluorescence microscopy techniques, that a GFP-fused-NCp7 protein transiently overexpressed or a micro-injected NCp7 labeled by a fluorescent aminoacid analogue binds preferentially to ribosomal RNA (Anton et al., 2015).

In this context, in order to decipher the functional role of NCp7 in the nucleus and more specifically in the nucleoli, we searched for a specific nucleolar partner of NCp7 in order to characterize its interaction with NCp7 and the functional consequence of this interaction. Several databases of potential partners of the HIV-1 proteins were published recently (Jager et al., 2012), (Konig et al., 2008; Yeung et al., 2009). Among these proteins, we focused our attention on the human nucleolar protein hNoL12 which was identified as a potential specific NCp7 partner as it was not retrieved with Gag. hNoL12 is a 25kDa nucleolar RNA-binding protein which possesses several orthologs called Nop25 in *Rattus Norvegicus*; Rrp17p in the yeast *S. Cerevisiae*, and viriato in *Drosophila*. The very few data available on hNoL12 come from a set of studies on Nop25 showing that it harbors several nuclear and nucleolar localization signals (Suzuki et al., 2006). Moreover, a knock-down of Nop25 in cells leads to

the fragmentation of the nucleolus, underlining the importance of Nop25 in the architecture of the latter (Suzuki et al., 2007). Most of the functional data are coming from the study of the yeast protein Rrp17p, which has been shown to be a 5'-3'-RNA exonuclease involved in the nucleolar maturation of the 5' end of the 60S ribosomal RNA subunit. In addition, Rrp17p is thought to participate to the rRNA transport from the nucleoli towards the nuclear membrane making a link between ribosome assembly and transport. Rrp17p knock-out is lethal for the yeast and can be rescued by the expression of hNoL12 underlining the fact that the two proteins must share some if not all of their functions (Oeffinger et al., 2009).

In this work, we showed that i/ hNoL12 interacts with NCp7 in the nucleolus of mammalian cells, ii/ the interaction domain with NCp7 is localized on the on its exonuclease domain, iii) hNoL12 is endowed with a 5'-to-3'-end ssRNA exonuclease activity and iv/ the knockdown of hNoL12 by siRNA results in a decrease of HeLa cells infection by a non replicative model of an HIV-1 infection.

Materials and Methods

Mammalian Cell Culture and plasmids transfection

HeLa cells (ATCC CCL2) and 293T (ATCC : CRL-3216) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco® Life Technologies ref 21885) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and a mixture of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (10 U/mL) antibiotics (Lonza DE17-602E) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected, using jetPEI™ Polyplus Transfection™ according to the manufacturer's protocol.

Plasmids

The pET52-hNoL12 vector used in the purification of recombinant hNoL12 was a generous gift from Dr.M Oeffinger Marlene (Institut de recherches cliniques de Montreal). The plasmid constructs for VSV-G pseudotyped HIV-1 particles: pMD2.G, pCMV-dR8.91 were obtained from Addgene. pSicoR-luciferase was obtained by the replacement of the eGFP cDNA in pSicoR-eGFP by the firefly luciferase cDNA between the NheI and EcoRI cloning sites. peGFP-hNoL12 was cloned by Gateway® cloning from pET52-hNoL12 vector, using the primers listed in **supplementary table 1** into the destination vector peGFP-C1-GW. hNoL12 deletions mutants and phNoL12 ActII were also generated by Gateway® cloning from peGFP-hNoL12 using the primers listed in **supplementary table S1** into destination vectors

peGFP-C1-GW and pActII-GW respectively. peGFP-NoL Δ (22-61) was generated by site directed mutagenesis using Phusion site-directed mutagenesis kit (Thermoscientific, F1504) according to the manufacturer's instructions using the primers listed in **supplementary table S1**.

Protein Purification

E.coli BL21(DE3)pLysS cells transformed with pET52-hNoL12 coding hNoL12 fused to a 10XHis tag were cultured in LB medium supplemented with Ampicillin (100 μ g/mL) and chloramphenicol (25 μ g /mL). Recombinant protein production was performed by inoculating a single colony into 50 mL LB medium containing antibiotics, and cultured at 37°C, overnight with shaking at 200 rpm. The overnight culture was used to inoculate 1 Liter LB medium containing antibiotics. The culture was grown at 37°C, 200 rpm, until an OD_{600nm} of 0.6 was reached. Protein expression was induced by the addition of 1mM IPTG for 4 hours at 30°C (**Supplementary Figure S2**). Bacteria were harvested and snap freezed in liquid nitrogene and stored at -80°C. Cells were thawed on ice and lysed by sonication in 35 mL of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 1M NaCl; 0,05% Triton-100; one tablet of complete Mini-EDTA free protease inhibitor Cocktail Tablets- Roche) at 4°C. The lysate was clarified by centrifugation for one hour at 15000 rpm at 4°C and loaded on a nickel column (25 mL, Ni-NTA agarose column, GE Healthcare) previously equilibrated with Buffer A (20mM Tris-HCl pH 7.5; 250mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1mM DTT). The protein was eluted in buffer B (20mM Tris-HCl pH 7.5; 250mM NaCl; 5mM MgCl₂; 5mM imidazole; 1mM DTT) with a linear gradient of imidazole from 5 to 500mM. Aliquots of the eluate fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing hNoL12 (**Supplementary Figure S2**) were pooled and dialyzed overnight against buffer A. The dialyzed protein was loaded on cationic exchange column (25 mL, DEAE sepharose fast flow ion exchange, GE Healthcare) previously equilibrated with buffer A. The protein was eluted in buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 2 M NaCl; 5 mM MgCl₂) with a linear gradient of buffer A (NaCl concentration gradient from from 250 mM to 2 M). The proteins were detected by UV absorption at 280 nm. Fractions corresponding to the peak of absorption were analyzed by SDS-PAGE. Fractions containing the hNoL12 (**Supplementary Figure S2**) were pooled and concentrated on centricon 10kDa filters.

Exonuclease assay and fluorescence measurements

Exonuclease assays were performed in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT in the presence of 3 μM hNoL12 and 3 μM RNA (5'-UCXCGGCUCAGCUGUGAAAGGCCGUGA-3') labelled at position 3 by 2-aminopurine (2AP) indicated as X in the sequence. Kinetic measurements and fluorescence emission spectra were recorded at 37°C on a Fluorolog spectrofluorimeter (Jobin Yvon) equipped with a thermostated cell compartment. Fluorescence spectra were corrected for Raman scattering and lamp fluctuations. The 2AP was excited selectively at 315 nm and the maximum emission was recorded at 375 nm.

Fluorescence anisotropy

Binding experiments of hNoL12 to the 5'-TAMRA labeled RNA (5'-Tamra-CAGCAGUACAAAUGGCAGAUUC-3') were performed in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT by fluorescence anisotropy (FA). Measurements were performed in quartz cuvettes using a Fluorolog spectrophotometer (Jobin Yvon) equipped with a Peltier thermostated cell holding the sample at 20°C. FA values were obtained by recording the I_{VV}, I_{VH}, I_{HV} and I_{HH} intensities (V and H characterizing the vertical and horizontal light polarization for the excitation and the emission paths, respectively) of each solution. The steady-state anisotropy r was calculated according to: $r = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2 G \cdot I_{VH})$ in which $G = I_{HV} / I_{HH}$. The analysis of the binding data using the following equation:

$$S = S_0 + (S_t - S_0) \cdot \frac{1 + K \cdot (P_t + n \cdot N_t) - ((1 + K \cdot (P_t + n \cdot N_t))^2 - 4 \cdot n \cdot N_t \cdot P_t \cdot K)^{0.5}}{2 \cdot n \cdot K \cdot N_t}$$

Where S₀ and S_t represent the anisotropy value of the oligonucleotide before the addition of hNoL12 and at the saturation plateau respectively, n is the number of binding site, N_t is the concentration of the RNA, allows the determination of the value of the dissociation constant (K_d) of the interaction. Excitation and emission wavelengths were set at 520 nm and 581 nm, respectively.

Confocal microscopy

24 hours before transfection with the plasmids coding the appropriate proteins, HeLa cells were seeded in 12 well plates on a glass coverslips at a density of 8 × 10⁴ cells/well. 24 h post-transfection, the cells were washed with 1X PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature (RT). After fixation,

cells were washed three times with 1X PBS and mounted on slides using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen Reference 36930). Images were acquired with a Leica TC SPE II confocal microscopy using a 63×1.4NA oil immersion objective (HXC PL APO 63×/1.40 OIL CS). The eGFP images were obtained by scanning the cells with a 488 nm laser line and using a 500 to 555 nm band-pass for emission. For the mCherry images, a 561 nm laser line was used with a 570 to 625 nm band-pass. Images were analyzed by Image J software.

Immunofluorescence

After fixation, cells were permeabilized with 1% Triton-100 in PBS for 10 min at RT and blocked in 1% BSA in PBS (Bovine serum albumin, Euromedex, ref 04-100-811-C) for one hour before being stained. The cells were subjected to immunofluorescence staining with a rabbit anti-hNoL12 antibody (Bethyl laboratories NP_077289.1; dilution 1:500) for 2h at RT. The cells were then washed with 1X PBS three times and incubated with Alexa 568-labeled anti-rabbit secondary antibody (Thermo Fischer A11011; dilution 1:1000) at RT for 1 h. After washing, cells were analyzed by confocal microscopy as described before.

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)

FLIM measurements were performed using the time-correlated single photon counting approach, on a homemade two-photon excitation scanning microscope based on an Olympus IX70 inverted microscope with an Olympus 60X 1.2NA water immersion objective operating in the descanned fluorescence collection mode (Azoulay et al., 2003; Clamme et al., 2003). Two-photon excitation at 900 nm was provided by a mode-locked titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) or an Insight DeepSee (Spectra Physics) laser. Photons were collected using a set of two filters: a short-pass filter with a cutoff wavelength of 680 nm (F75-680; AHF, Germany) and a band-pass filter of 520 ± 17 nm (F37-520; AHF, Germany). The fluorescence was directed to a fiber-coupled APD (SPCM-AQR-14-FC; PerkinElmer), which was connected to a time-correlated single photon counting module (SPC830, Becker & Hickl, Germany). Typically, the samples were continuously scanned for about 60s to achieve the appropriate photon statistics in order to reliably analyze the fluorescence decays. Moreover, to reach the Nyquist–Shannon sampling criteria, we carried out FLIM measurements using $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ scale and $256 \text{ pixels} \times 256 \text{ pixels}$. Data were analyzed using a commercial software package (SPCImage v2.8; Becker & Hickl, Germany). For Förster resonance energy transfer (FRET) experiments, the FRET efficiency (E) was calculated according to: $E=1- (\tau_{DA}/ \tau_D)$, where τ_{DA} is the lifetime of the donor (eGFP) in the

presence of the acceptor (mCherry) and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor.

Co-immunoprecipitation

24 hours before transfection or co-transfection with 2 μ g of each of the plasmids encoding for the appropriate proteins, 293T cells were seeded in 6 well plates at a concentration of 6×10^5 cells/well. Transfected cells were harvested and lysed after 48h in the following buffer: Tris-HCl 10 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, and 1% NP40, complete Mini-EDTA free protease inhibitor Cocktail Tablets (Roche). Cell lysates were cleared by centrifugation and the protein concentration was assessed by a Bradford assay. An input fraction (30 μ g) was kept to check the protein expression level, and the equivalent of 1.5 mg of lysate was incubated 2 h at 4°C with 1 μ g of anti-Flag antibody (Sigma, F1804) on a rotating wheel. After equilibration, 50 μ L of dynabeads protein A (Life technologies, 10002D) were added and the mixture was incubated for 1 h at 4°C. Beads were washed 3 times with the lysis buffer, resuspended in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, 161-0747), boiled for 5 min, and analyzed by Western blot.

Western blots

Proteins and cell lysates were analyzed on 12% SDS-PAGE gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, RPN303F). Membranes were immunoblotted either with an anti-Flag (Sigma F1804; dilution 1:4000), an anti-eGFP (Proteintech, 66002-1; dilution 1:10000) or an anti-GAPDH antibody (Millipore, MAB374, dilution 1 :5000) for one hour at RT. Membranes were washed with TBS-T three times for 10 min, and then incubated with secondary antibodies (Promega WB401B and W402B) conjugated to the horseradish peroxidase (Promega WB401B and W402B; dilution 1:10000) for one hour at RT. After washing the membranes with TBS-T, signals were visualized using a homemade chemiluminescent ECL system on an Image Quant LAS 4000 apparatus (GE healthcare).

Yeast two-hybrid

Using the Gateway® cloning technology (Life Technologies), the hNoL12 cDNA was cloned into pActII in fusion with the Gal4 Activation Domain (Gal4-AD). NCp7 was cloned into pGBKT7 in fusion to the Gal4 binding domain (Gal4-BD). Each pActII and pGBKT7 constructs were introduced into the *S. cerevisiae* strain AH109 (MAT a, trp 1-901, leu2-3,

112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4AD*, *gal80DLYS2* : GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ) or Y187 (*MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3-112*, *gal4 Δ* , *met⁻*, *gal80 Δ* , URA3:UASGAL1-lacZ, MEL1) respectively using a LiAc procedure (Gietz et al., 1995). The transformant cells were selected for Leu (pActII constructs) or Trp (pGBKT7 constructs) auxotrophy on minimal media plates. The diploids cells, obtained after mating of two transformant cells, were selected on minimal medium depleted for Leu and Trp. After 3-4 days growth, transformant were replated on minimal medium depleted for Leu, Trp and His.

Pseudovirus production and quantification

For viral production, 5×10^6 293T cells were plated onto 100 mm plastic culture dishes. The next day, cells were co-transfected with 3 μ g of pMD2.G, 12 μ g of pSiCoR-luciferase, and 6 μ g of pCMV-dR8.91 vectors. 48 hours post transfection, cell culture supernatants were collected, passed through a 0.45 μ m pore PVDF low binding filter (Millipore SLHV033RS), and concentrated twice on a Vivaspin20 (Sartorius, VS2031). Particles were aliquoted and stored at -80°C . Viral stocks were titrated by quantification of p24 viral antigen in the cell supernatants by anti-p24 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Innotest® HIV Antigen mAb).

Pseudoviral infection and protein knockdown

24 hours before transfection with 50 nM of control siRNA or hNoL12 siRNA (Dharmacon LU-015834-00-0002 and L-014330-02) using Dharmafect reagent (Dharmacon, Dharmafect1, T-2001-02), HeLa cells were seeded in 6 well plates at a concentration of 10×10^4 cells/well. 72 hours post transfection; cells were infected with a viral supernatant volume equivalent to 360 ng p24/well in a complete DMEM containing 8 μ g/mL polybrene. After 8 hours incubation, the cell supernatant was removed and replaced by free virus medium. Cells were kept for 48h before lysis and RNA extraction. In this experiment, zidovudine added at 1 μ M at the moment of the infection was used as a positive control and kept along the infection.

Quantitative PCR

RNA was extracted from cells with the Qiagen RNeasy plus mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Then, 1 μ g of RNA was reverse transcribed into cDNA using iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). The PCR amplifications were carried out in

MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems) in a total volume of 20 μ L using the SybrGreen method (SybrGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems Applied Biosystems, 4385612). Each condition contained 50 ng cDNA and 300 nM primers. Gene expression was normalized to housekeeping genes 18S. Primers for luciferase were: forward: 5'-TGAGTACTTCGAAATGTCCGTC, reverse: GTATTCAGCCCATATCGTTTCAT. Primers specific for 18S were: forward: 5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3' and Reverse: 5'-TCCAGACCATTGGCTAGGAC-3'. Quantitative PCR was done in a StepOne Plus (Applied Biosystems), and the results were analyzed with the $\Delta\Delta$ CT method with untreated cells as controls.

Results

HIV-1 NCp7 and hNoL12 colocalize in the nucleolus

HeLa cells were transiently transfected with either peGFP, peGFP-NCp7, pNCp7-eGFP, pNCp7-mCherry or peGFP-hNoL12 and fixed 24 h later. The endogenous hNoL12 protein was detected by immunofluorescence in fixed and permeabilized HeLa cells expressing NCp7-eGFP. We found a strong endogenous hNoL12 signal in the nucleoli and a diffuse one all over the cell cytoplasm (**Figure 1A**). The nucleolar hNoL12 localization is in agreement with the one of endogenous rat Nop25 which was found to be restricted to the nucleolus in COS7 cells (Suzuki et al., 2006). As eGFP-hNoL12 (**Figure 1B**) was found to be mainly restricted to the nucleolus, the cytoplasm localization of hNoL12 revealed by immunofluorescence is most likely due to a non specific binding to a cytoplasmic epitope. NCp7 was shown to be localized in all cellular compartments with a particular concentration in the nucleus and the nucleolus for eGFP-NCp7 (**Figure 1F**) and in the nucleolus and the cytoplasm for NCp7-mCherry and NCp7-eGFP (**Figure 1C and 1E respectively**). This localization is due to NCp7 as eGFP expressed alone (**Figure 1D**) is found with an equal repartition all over the cell.

Interestingly, we observed a strong co-localization of endogenous hNoL12 and NCp7-eGFP in the nucleoli (**Figure 1G3**) as well as between eGFP-hNoL12 and NCp7-mCherry (**Figure 1H3**). We can therefore conclude that hNoL12 and NCp7 co-localize in the nucleoli.

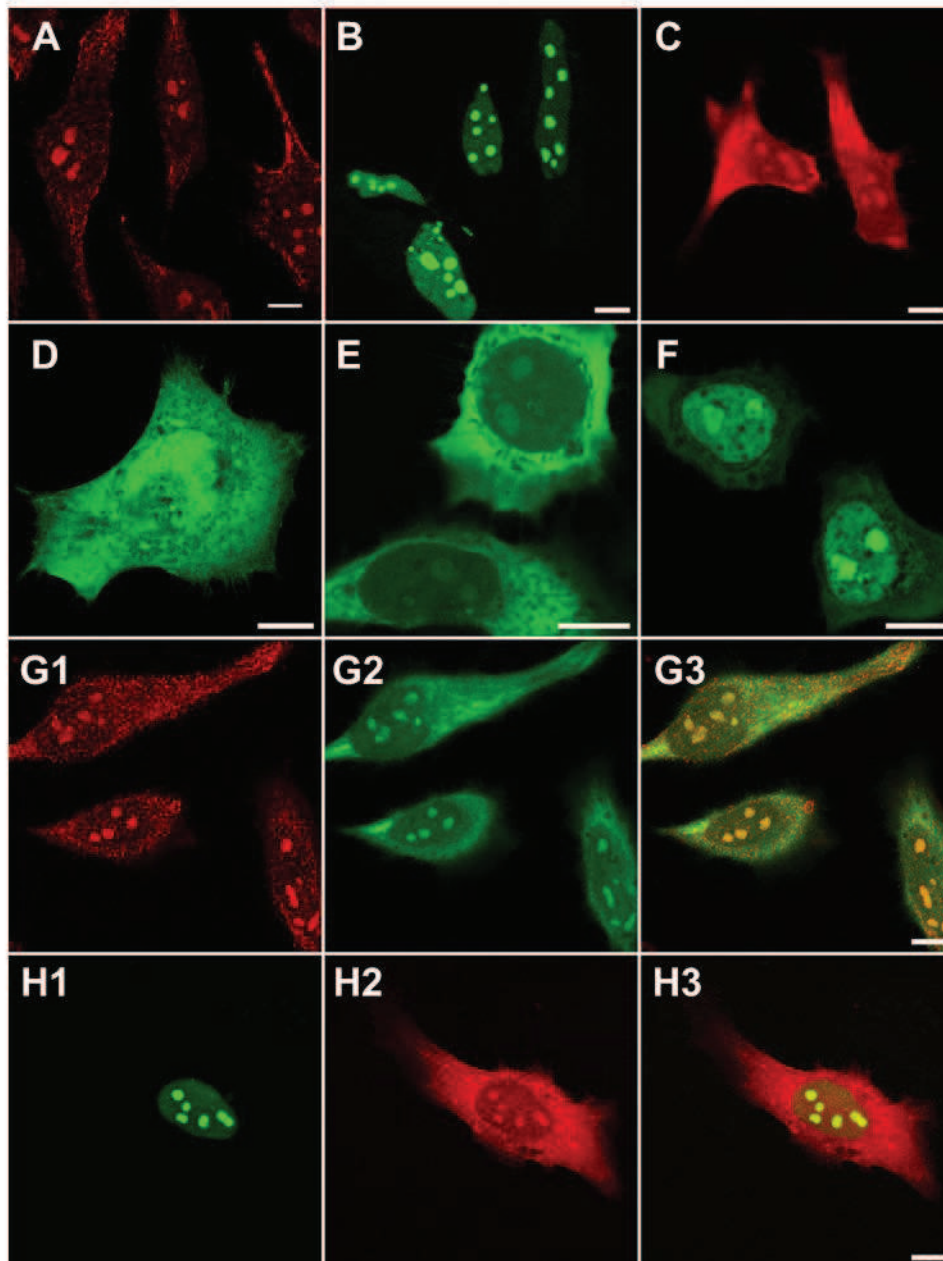


Figure 1: Cellular colocalization of hNoL12 with NCp7. Intracellular distribution of endogenous hNoL12 (A), eGFP-hNoL12 (B), NCp7-mCherry (C), eGFP (D), NCp7-eGFP (E), eGFP-NCp7 (F). 24 hours after transfection with plasmids coding the labeled proteins, HeLa cells were fixed with PFA and permeabilized in order to be immunostained with an anti-hNoL12 primary antibody and a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 568 as described in materials and methods. Cells were imaged using confocal microscopy. G1 and G2 show endogenous hNoL12 and NCp7-eGFP, respectively. H1 and H2 show eGFP-hNoL12 and NCp7-mCherry, respectively. G3 and H3 are the composite images of G1-G2 and H1-H2, respectively. The scale bars correspond to 10 μ m.

Study of the interaction NCp7/hNoL12 by FRET-FLIM

Since hNoL12 and NCp7 co-localized in HeLa cells, we checked for their direct interaction using FRET-FLIM (Förster Resonance Energy Transfer-Fluorescence Lifetime Imaging

Microscopy) experiments on live HeLa cells co-transfected with plasmids coding the two proteins fused to eGFP and mCherry as fluorescence donor and acceptor, respectively. A FRET between eGFP and mCherry only occurs when both fluorophores are less than 8 nm apart, a distance corresponding to intermolecular protein–protein interactions (Bastiaens and Squire, 1999; Voss et al., 2005). By measuring the fluorescence decay at each pixel of the cell, the FLIM technique allows the extraction of the fluorescence lifetime (τ) that, in contrast to fluorescence intensity, does not depend on the instrumentation or the concentration of each fluorophore. The occurrence of FRET is associated with a decrease of the eGFP fluorescence lifetime, indicating an interaction between the two proteins of interest.

As a control, cells expressing eGFP-hNoL12 in the absence of NCp7-mCherry were imaged to determine the mean fluorescence lifetime (τ_m) of eGFP-hNoL12 (**Figure 2A**). The fluorescence lifetime, as indicated through a color code in **Figure 2A**, is 2.44 ± 0.07 ns, which is very similar to the one of free eGFP (El Meshri et al., 2015). Co-expression of eGFP-hNoL12 and NCp7-mCherry resulted in a significant decrease of the fluorescence lifetime, as shown by the color change with respect to the control in **Figure 2B1**. This is even more visible when the eGFP-hNoL12 lifetime distribution of all the measured pixels in 15 imaged cells is plotted (**Figure 2C**), showing a clearly shifted distribution towards lower lifetimes in the presence of mCherry-labeled NCp7. The average lifetime value in the presence of NCp7-mCherry is 2.14 ± 0.06 ns (**Figure 2B1**) giving an average FRET of 12%; a value above the 5% threshold, required to define a bona fide interaction (Voss et al., 2005). A more relevant way to analyze the fluorescence decays is to use a two components model which allows taking into account the coexistence of bound and free eGFP-hNoL12 populations with two different fluorescence lifetimes. In this two components model: $F(t) = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2}$, the long-lived lifetime τ_2 is associated with the free eGFP-hNoL12 and is thus fixed at the lifetime of eGFP-hNoL12 expressed alone (2.44 ns). In contrast, the short component τ_1 is associated to the bound species undergoing FRET and its value as well as its population α_1 are allowed to float. Using this two model component, we found that 35% of the eGFP-hNoL12 (**Figure 2B2**) was able to FRET with NCp7-mCherry with a high FRET efficiency above 43% indicating a close distance between the fluorescent proteins in the complex (**Figure 2B3**). All together, these data clearly demonstrate an interaction between NCp7-mCherry and eGFP-hNoL12 in the cells.

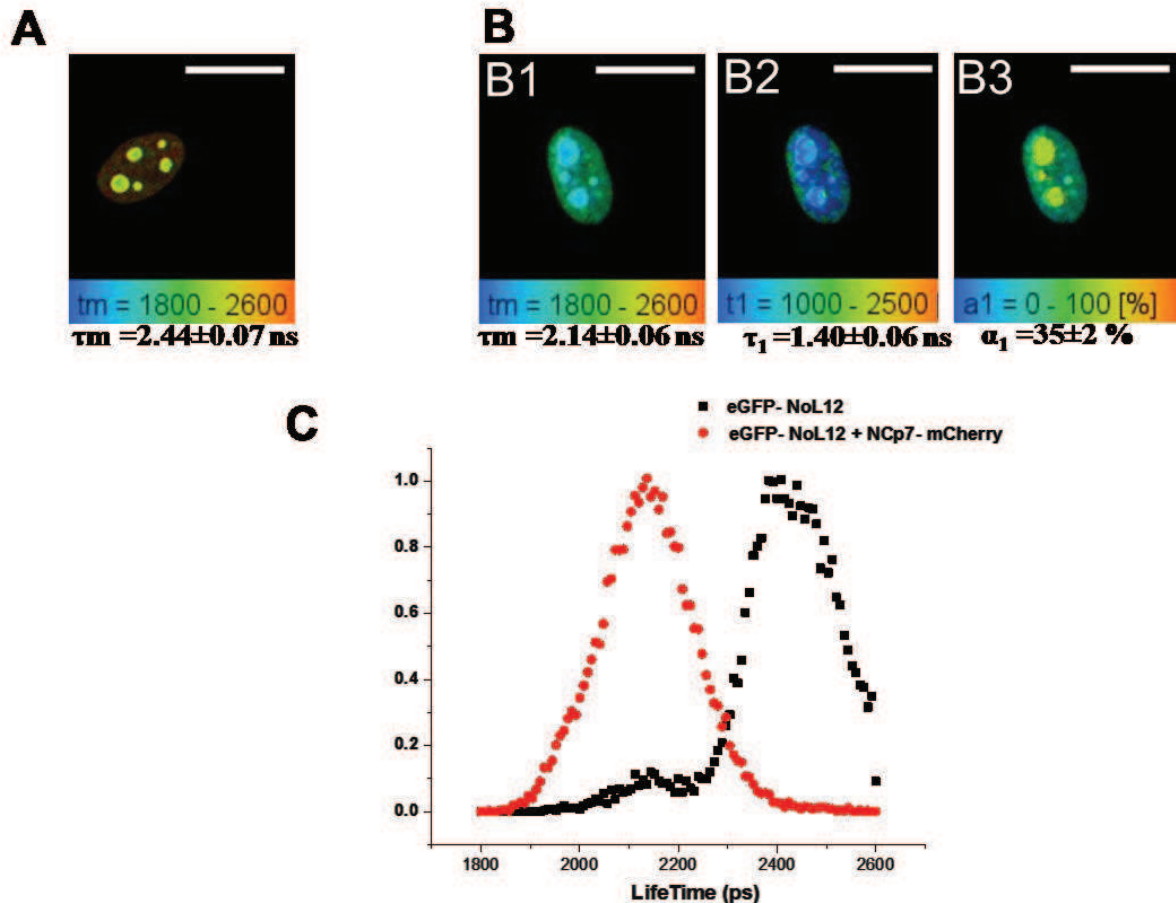


Figure 2: Study of the NCp7-hNoL12 interaction by FRET-FLIM. HeLa cells were transfected by peGFP-hNoL12 without (A) or with pNCp7-mCherry (B). 24 h post-transfection, the fluorescence decays were measured for each pixel and analyzed using a one or two-population model. The mean eGFP fluorescence lifetime (τ_m) value of each pixel converted into a color code is given in A and B1 for the one population analysis. In B2 and B3 are given the values of the short-lived lifetime (τ_1) and its amplitude (α_1), when a two-population model was used to treat the data. Scale bars correspond to 1 μm . (C) Normalized distribution of τ_m values, expressed in picoseconds for cells expressing eGFP-hNoL12 in the absence (black) or in the presence of NCp7-mCherry (Red).

The NCp7-hNoL12 interaction is RNA dependent

The interaction between NCp7 and hNoL12 was confirmed by co-immunoprecipitation experiments (co-IP) performed on lysates from 293T cells co-transfected with plasmids coding for Flag-NCp7 and eGFP-hNoL12 and analyzed by western blot (Figure 3).

The correct expression and detection of Flag-NCp7 (Figure 3, lanes 2, 4, and 5), eGFP-hNoL12 (Figure 3, lanes 3 and 4) and eGFP (Figure 3, lane 5) was controlled by western blot using an anti-Flag or an anti-eGFP antibody in parallel to the homogenous loading of the input (western-blot anti-GAPDH). The specific Flag-NCp7 immunoprecipitation by an anti-Flag is observed in Figure 3 lanes 2', 4', 4'', 5' as it does not occur in the absence of an anti-

Flag antibody (lane No@). The eGFP-hNoL12 coimmunoprecipitation is observed only in the presence of Flag-NCp7 (**Figure 3** compare lanes 4' and 3') and is not due to the eGFP tag as revealed by the absence of eGFP co-immunoprecipitation with Flag-NCp7 (**Figure 3** lane 5'). The interaction between Flag-NCp7 and eGFP-hNoL12 is thus detectable by co-IP. As both NCp7 and hNoL12 interact with nucleic acids and particularly RNAs, a co-IP was also performed from a cell lysate expressing Flag-NCp7 and eGFP-hNoL12 after treatment with RNase. A loss of the NCp7-hNoL12 interaction was observed underlining the RNA-dependent nature of the NCp7-hNoL12 interaction (lane 4''; **Figure3**).

Taken together, our results demonstrate an RNA-dependent interaction between HIV-1 NCp7 and hNoL12 *in cellulo* after transient overexpression of both proteins in cells.

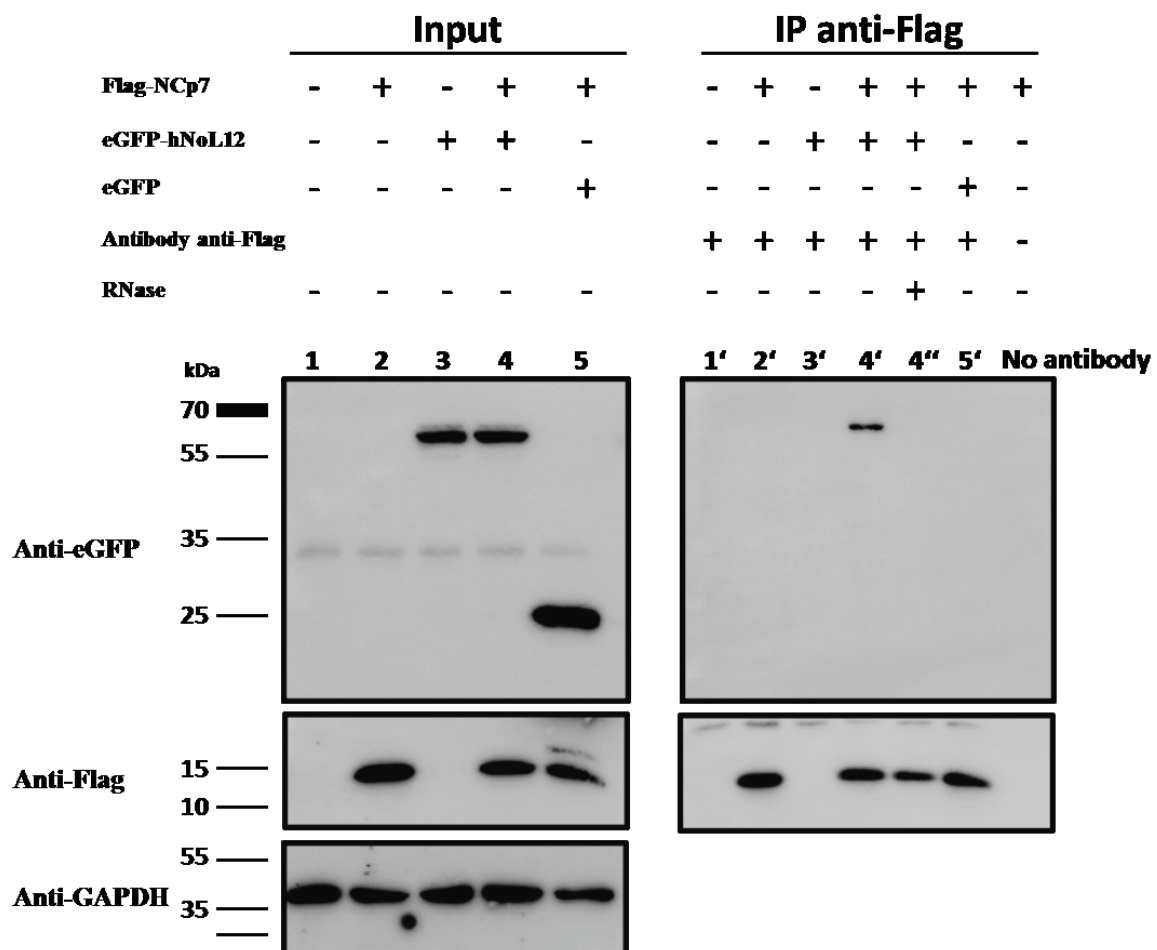


Figure 3: Interaction between hNoL12 and NCp7 analyzed by co-immunoprecipitation.

Lysates of non transfected 293T cells (lane 1 and 1') were compared with lysates of the same cells transfected with pFlag-NCp7 (lane 2 and 2'), peGFP-hNoL12 (3 and 3'), peGFP (lane 5 and 5') or co-transfected with pFlag-NCp7 and peGFP-hNoL12 (lane 4, 4' and 4'') or peGFP (Lane 5 and 5'). The lysates were loaded on an SDS-PAGE gel before (1 to 5) or after (1' to 5') immunoprecipitation with protein A beads linked to an anti-Flag antibody. Lane No@ represents the lysate used in 2' incubated with beads without the anti-Flag antibody. After transfer to a nitrocellulose membrane, the presence of each protein is revealed by western blot using the indicated antibodies.

The interaction between the two proteins was also confirmed by a two hybrid assay in the yeast *S. cerevisiae*. In this assay, the full length cDNAs coding hNoL12 or rat rNop25 were cloned in fusion to the Gal4AD as NCp7 was in fusion to Gal4BD. As seen in **Figure 4** only the yeasts expressing both Gal4AD-hNoL12 or Gal4AD-rNop25 and Gal4BD-NCp7 were able to grow on the selective medium lacking histidine, reflecting the formation of a functional Gal4 transcription factor. Controls consisting in the co-expression of Gal4AD-hNoL12 with Gal4BD or Gal4AD with Gal4BD-NCp7 were unable to grow in the same conditions indicating that the Gal4 activation observed was not due to a transactivation of one of the construct alone. As the fusion protein Gal4AD-NCp7 is toxic for the yeast, the interaction could not be tested with hNoL12 and NCp7 fused to Gal4BD and Gal4AD, respectively.

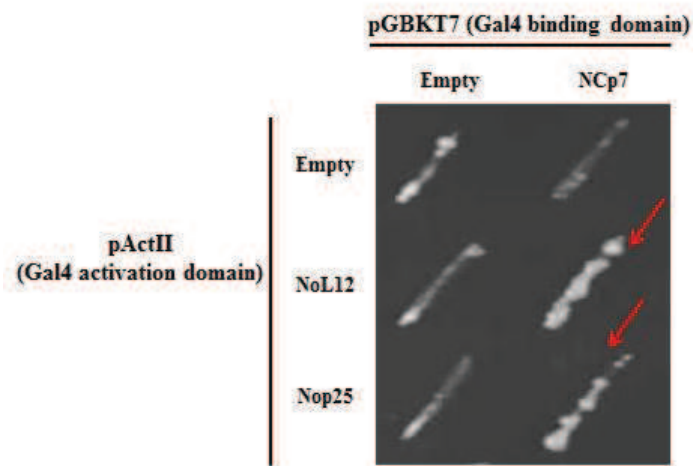


Figure 4: Interaction between hNoL12 and NCp7 revealed by yeast two-hybrid assay. Yeasts were grown on selective media lacking His, Leu and Trp. AH109 and Y187 *S. cerevisiae* strains were transformed with pActII or pGBKT7 constructs, selected on -Leu and -Trp media, respectively before to be mated. The diploid yeast cells expressing Gal4AD-hNoL12 and Gal4BD- NCp7 selected on -Leu; -Trp media were analyzed for their growth on -Leu,-Trp,-His selective plates.

hNoL12 interacts with NCp7 via its exonuclease domain

In order to identify the hNoL12 domain responsible for the interaction with NCp7, we constructed deletion mutants which are presented in **Figure 5**. To design these mutants, we took into consideration the structural and biochemical data available on Rrp17p and rNop25 in order to localize the putative exonuclease domain and RNA binding domain, as well as the putative nuclear and nucleolar signaling sequences of hNoL12. First, we constructed the mutants B, C, D, E, and F in fusion to eGFP and tested them for their co-immunoprecipitation

with Flag-NCp7 from lysates of 293T cells transfected with plasmids encoding hNoL12 mutants and Flag-NCp7. The immunoprecipitates were analyzed by western blot (**Figure 6**).

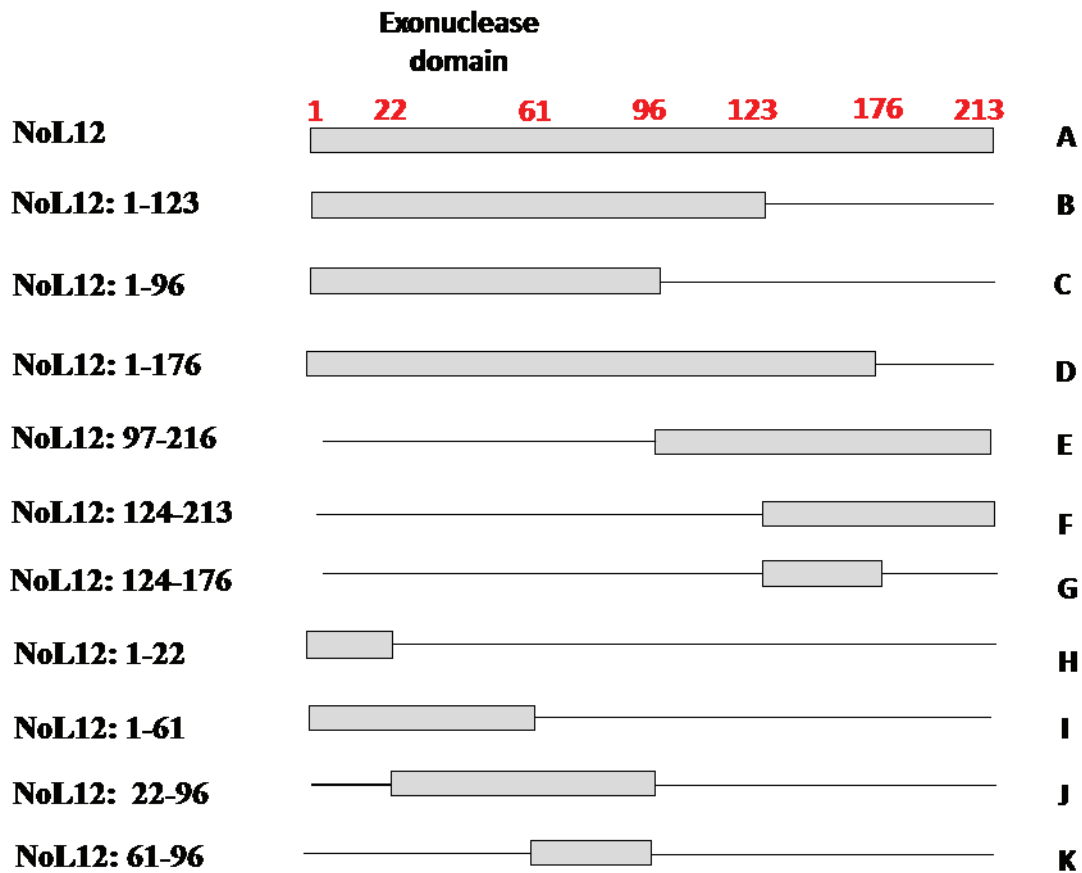


Figure 5: Determination of hNoL12 domains interacting with NCp7. Each hNoL12 deletion mutant was cloned in fusion to the C-terminus of eGFP.

We observed in the input (input lanes 1 to 15), the expression and detection at the appropriate sizes of all the hNoL12 fragments and NCp7. Flag-NCp7 protein was immunoprecipitated with an anti-Flag antibody (lane 2', 4' to 15'). The mutants B, C and D (lane 5', 6' and 7') co-immunoprecipitated with Flag-NCp7 underlining the importance of the hNoL12 N-terminal 96 a.a. in the NCp7-hNoL12 interaction.

Based on these results and in order to determine more precisely the hNoL12 domain implicated in the interaction with NCp7, we constructed the mutants H, I, J and K fused to eGFP (**Figure 5** lanes 11 to 15 and 11' to 15'). The mutants I and J co-immunoprecipitated with Flag-NCp7 (lane 12' and 13'), indicating that the interaction domain could be restricted to the a.a. 22-61 which corresponds to the putative exonuclease domain of hNoL12 (**Supplementary Figure S3**). In parallel, we studied the cellular localization of these mutants (B to K) in HeLa cells (**Supplementary Figure S4**).

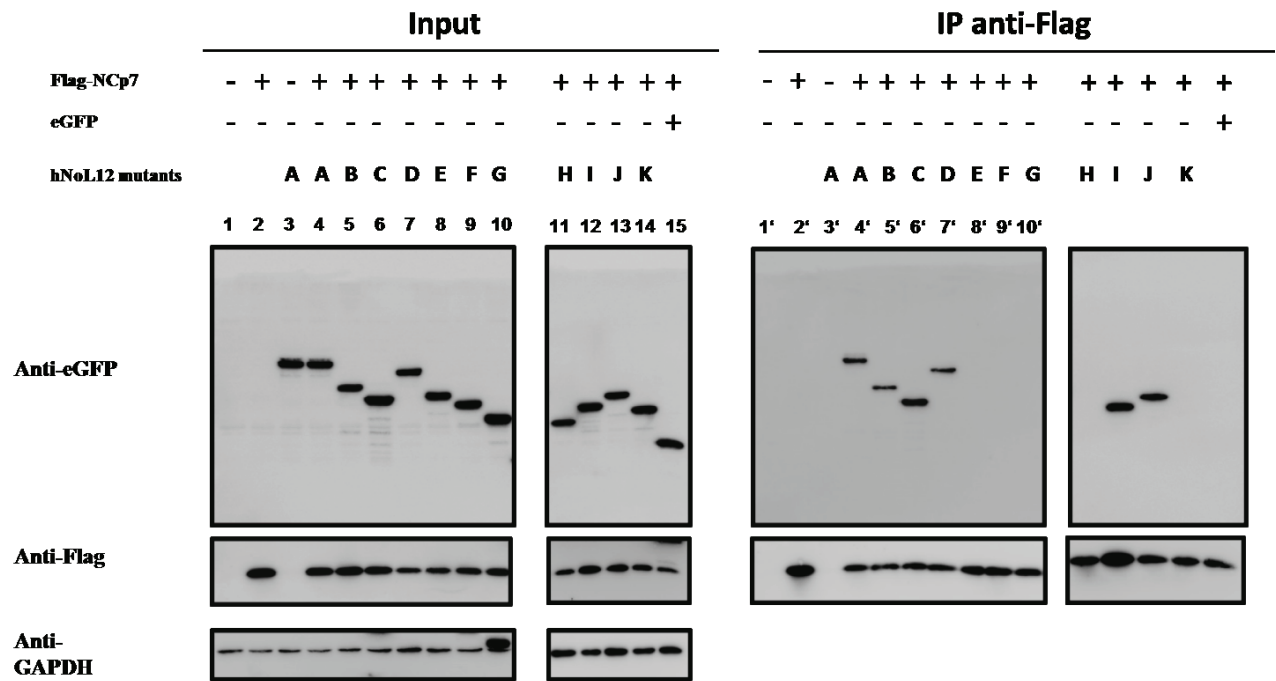


Figure 6: Mapping of the hNoL12 domain interacting with NCp7. Lysates of non transfected 293T cells (lane 1 and 1') were compared with lysates of the same cells transfected with pFlag-NCp7 (lane 2 and 2'), peGFP-hNoL12 (3 and 3'), peGFP (15 and 15') and co-transfected with pFlag-NCp7 and peGFP-hNoL12 (lane 4 and 4') or peGFP-hNoL12 mutants (lane 5 to 15 and 5' to 15'). The lysates were loaded on an SDS-PAGE gel before (1 to 15) or after (1' to 15') immunoprecipitation with protein A beads loaded with anti-Flag antibody. After transfer to a nitrocellulose membrane, the presence of each protein is revealed by western blot using the mentioned antibodies. GAPDH was used as a loading control.

Finally, to confirm that the a.a. 22-61 of hNoL12 are implicated in the interaction with NCp7, we constructed two hNoL12 mutants fused to eGFP. The first one corresponds to the putative interacting domain (hNoL12(22-61)) and the second one corresponds to hNoL12 deleted of a.a. 22-61 (hNoL12 Δ (22-61)). As shown in **Figure 7**, these mutants were tested for their co-immunoprecipitation with Flag-NCp7. We observed in the input the correct expression and detection at the expected size of both mutants (lane 4, 5, 7 and 8). The co-immunoprecipitation of hNoL12(22-61) (lane 7') and the lack of co-immunoprecipitation of hNoL12 Δ (22-61) with Flag-NCp7 (lane 8') indicates that a.a. 22-61 are necessary and sufficient for the interaction with NCp7.

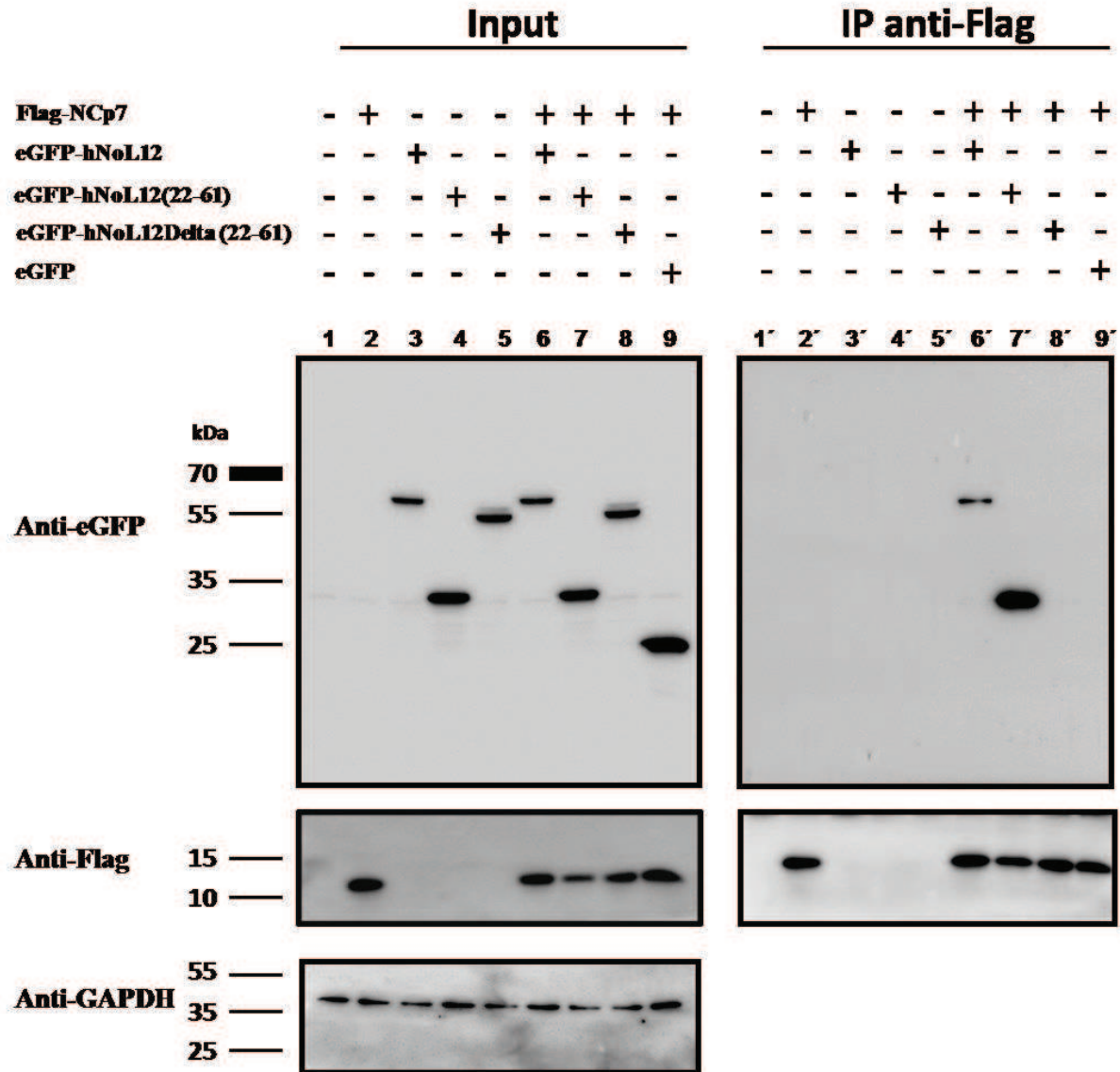


Figure 7: Mapping of the interaction domain between hNoL12 and NCp7 by co-immunoprecipitation. Lysates of 293T cells transfected with pFlag-NCp7 (lane 2 and 2'), peGFP-hNoL12 (lane 3 and 3'), peGFP-hNoL12 (22-61) (lane 4 and 4'), peGFP-hNoL12 Δ 22-61 (lane 5 and 5'), peGFP (9 and 9') and co-transfected with pFlag-NCp7 and peGFP-hNoL12 (lane 6 and 6') or peGFP-hNoL12(22-61) (lane 7 and 7') or peGFP-hNoL12 Δ 22-61 (lane 8 and 8'). Lanes 1 and 1' are the controls with lysates of non transfected 293T cells. Lysates were loaded on an SDS-PAGE gel before (1 to 9) or after (1' to 9') immunoprecipitation with protein A beads loaded with an anti-Flag antibody. After transfer to a nitrocellulose membrane, the presence of each protein was revealed by western blot using the mentioned antibody. GAPDH was used as a loading control.

Effect of hNoL12 knockdown on the infection by an HIV-1 lentivector.

Having validated the interaction between NCp7 and hNoL12 and mapped the interaction domain on hNoL12, we wondered what could be the role of hNoL12 in HIV-1 infection. To answer this question, we used a non replicative lentiviral vector based on HIV-1 as a model of

the early stages of infection. The lentivector is pseudotyped with the VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein) to enlarge the cellular tropism. Moreover, its pseudogenome contain only the the firefly luciferase (Fluc) gene allowing us to evaluate the infection rate by measuring the Fluc activity in infected cells lysates. As hNoL12 is implicated in ribosome maturation, its knock down could have an impact on protein synthesis in general and thus, on the synthesis of Fluc in particular. Therefore, to evaluate the impact of hNoL12 knock down on HIV-1 infection, we quantified the Fluc mRNA by RT-qPCR.

72h after siRNA transfection with either a control siRNA or siRNA against hNoL12, HeLa cells were infected with the lentiviral vector for 48h. The total RNA was extracted from infected cells and the mRNA for Fluc was quantified by qRT-PCR and normalized to the one of the housekeeping gene 18S. The proper hNoL12 knockdown was verified by western blot in comparison to GAPDH (**Figure 8A**). The reverse-transcriptase inhibitor zidovudine was used as a positive control for infection inhibition. In comparison to cells transfected with control siRNA, we observed a 40% decrease in the amount of mRNA coding Fluc after the knockdown of hNoL12 (**Figure 8B**). This decrease has to be compared to the 70% decrease observed when zidovudine (1 μ M) was used. Our data indicate that hNoL12 knockdown decrease the cell infection by a pseudotyped non replicative lentivector suggesting that hNoL12 is involved in the early phase of cell infection (from virus entry to its genome integration).

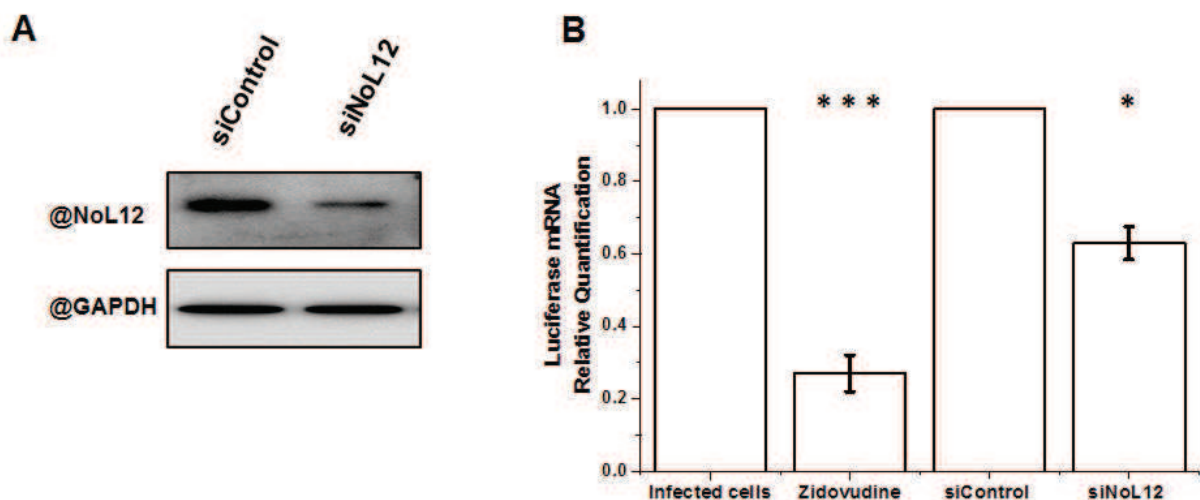


Figure 8: Effect of hNoL12 knockdown on an HIV-1 lentiviral vector infection. (A) Western blot against hNoL12 72h post-transfection of HeLa cells with siControl or siNoL12. GAPDH was used as a loading control. (B) Fluc mRNA measured by quantitative RT-PCR after lentiviral vector infection realized 72h post-transfection of HeLa cells with siControl or siNoL12. The relative quantification was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method using the housekeeping gene 18S as loading control. The relative amount is expressed taking 1 as the amount for non treated infected cells. Data of 4 independent experiments $p < 0.1$, $*** p < 0.001$. Error bars SEM.

Characterization of hNoL12 interaction with RNA

As the two hNoL12 orthologs rNop25 and Rrp17p are nucleolar RNA binding proteins that interact with ribosomal RNA (Fujiwara et al., 2006; Oeffinger et al., 2009), we performed fluorescence anisotropy titrations to characterize the binding of hNoL12 to RNA. To this end, we titrated a fixed concentration (60 nM) of a 5'-end TAMRA labeled 22 nucleotides RNA with a hNoL12 protein expressed in *Escherichia coli* and purified as a His-tag fusion protein (see materials and methods). As similarly to its ortholog Rrp17p, hNoL12 is most likely a 5'-3'-exonuclease, the label protects the RNA from hNoL12 driven degradation. As shown in **Figure 9**, addition of the protein induced an increase of the anisotropy value of the labelled RNA, indicating the binding of hNoL12 to the labeled oligonucleotide. The analysis of the binding data (see materials and methods) allows the determination of the value of the dissociation constant (K_d) of the interaction which was found equal to 20 nM.

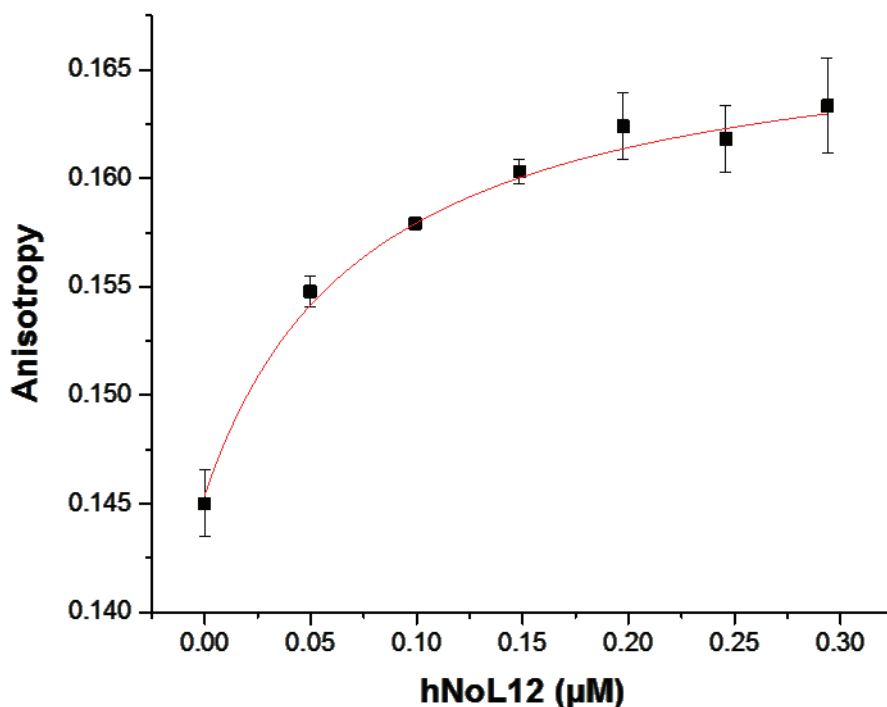


Figure 9: Characterization of the binding of hNoL12 to TAMRA- labeled RNA by fluorescence anisotropy. A fixed concentration of RNA (60 nM) was titrated by an increasing concentration of hNoL12. Anisotropy measurements were performed in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT at 20°C. Excitation and emission wavelengths of TAMRA were set at 520 nm and 580 nm, respectively. The graph represents the average anisotropy values of two independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

hNoL12 is 5'-3' exonuclease

Rrp17p, the yeast orthologue of hNoL12 is a Mg^{2+} -dependent 5'-3'-exonuclease implicated in rRNA maturation that plays a key role in yeast as its gene deletion is lethal. It was shown that hNoL12 is able to rescue a Rrp17p knockout suggesting that the proteins are functionally equivalent (Oeffinger et al., 2009). In order to characterize the exonuclease activity of hNoL12, we set up an assay based on the fluorescence of 2-aminopurine (2AP). This fluorescent adenine analogue is used extensively to monitor conformational changes and binding events in nucleic acids because its fluorescence properties are highly sensitive to the local environment. In our assay, we used oligonucleotides in which 2AP was incorporated at position 3 from the 5'end of the RNA. At this position, the 2AP fluorescence is largely quenched by its neighboring bases. As a consequence, we expect that removal of the two first nucleotides at the 5'-end and notably, removal of the 2Ap itself by the exonuclease activity of the enzyme would lead to a strong increase in the 2AP fluorescence. This assay was validated by the use of RNase, which was found to induce a 20-fold increase in the fluorescence of 2AP, indicating that our assay is well suited to monitor the exonuclease activity of hNoL12 (**Figure 10A**).

In a Mg^{2+} -containing buffer, after the addition of hNoL12 we observed a sudden increase of the 2AP fluorescence, likely corresponding to the binding of hNoL12 to the RNA (**Figure 10B**). This was followed by a slow and sustained increase in the fluorescence intensity. As this increase was not observed in the buffer without Mg^{2+} or when a 2AP-labelled ssDNA was used (data not shown), this strongly suggests that this increase describes the progressive Mg^{2+} -dependent digestion of the 5'end of the RNA by hNoL12. Altogether, our data indicate that hNoL12 is endowed with a Mg^{2+} -dependent exonuclease activity.

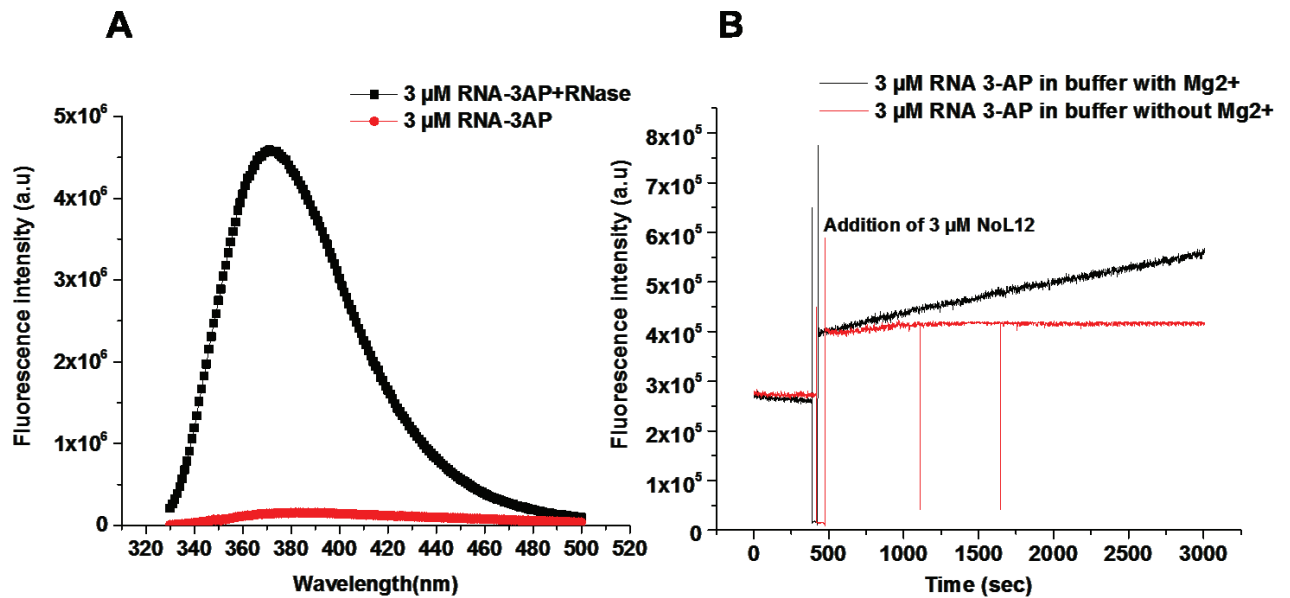


Figure 10: Monitoring hNoL12 exonuclease activity using 2AP fluorescence based assay. (A) Fluorescence emission spectra of 3 μM 2-AP-labeled RNA in the presence (black) and the absence (red) of RNase. **(B)** Time-dependence of the fluorescence intensity of 2AP labeled RNA before and after the addition of 3 μM hNoL12. Excitation and emission wavelengths of 2AP were set at 315 nm and 375 nm, respectively. The experiments were performed in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT at 37°C

Discussion

In this study, we confirmed by FRET-FLIM, co-IP and by yeast two hybrid the interaction of the host nucleolar protein hNoL12 with the mature NCp7 of HIV-1 but not with the NC domain containing polyprotein Gag (data not shown). This interaction was found to be RNA-dependent, as shown by the loss of interaction observed by co-IP when the cell lysates were treated with RNase. A similar RNA-dependent interaction was also reported with other host proteins, such as the host restriction factor APOBEC3G (Burnett and Spearman, 2007). The hNoL12 interacting domain with NCp7 was identified between a.a. 22 and 61 which by analogy to the 31-70 sequence of Rrp17p, is supposed to harbor a 5' to 3'-exonuclease activity. Moreover, we showed, for the first time, that hNoL12 possesses an exonuclease activity which is Mg²⁺ dependent and specific to RNA as we didn't observe this exonuclease activity on DNA or RNA/DNA duplex. Finally, we revealed that hNoL12 knockdown by siRNA inhibited by 40% HeLa cell infection by a lentiviral vector based on HIV-1 that mimics the early stages of infection.

For a long time, the exclusive function attributed to the nucleolus was the synthesis and maturation of ribosomes. However, more recently, the nucleolus has also been implicated in other functions that include gene silencing, senescence and cell cycle regulation (Hiscox,

2002; Klibanov et al., 2001). It is thus not surprising that the nucleolus constitutes a target of several cellular infections which alter its structure and composition. Upon infection, many virus proteins have been shown to localize in the nucleolus especially capsid and RNA binding proteins from the coronavirus (Dove et al., 2006; Wurm et al., 2001; You et al., 2005) and arterivirus nucleocapsids (Rowland et al., 1999; Tijms et al., 2002) and the dengue virus core protein (Wang et al., 2002). On the other hand, numerous nucleolar proteins redistribute out of the nucleolus during viral infection. Even if the impact of these redistributions on viral replication and host cell functions is not fully elucidated, some of them were characterized (Greco, 2009; Hiscox et al., 2010). For example, poliovirus cell infection directs the cellular protein nucleolin from the nucleolus to the cytoplasm (Waggoner and Sarnow, 1998) and inactivates the nucleolar transcription factor 1 protein UBF (upstream binding factor), decreasing the RNA polymerase I transcription in the infected cells (Banerjee et al., 2005). At the same time, disruption of the nucleolar localization of viral proteins affected viral pathogenesis. For example, a point mutation in the core protein of Japanese encephalitis virus (JEV) that abolished nucleolar localization decreased the virus replication in mammalian cells in comparison to wild-type viruses (Mori et al., 2005). In the case of HIV-1, a change in the nucleolar architecture has been observed in lymphocytes of patients infected with HIV-1 and this correlated with a loss of cell cycle control (Galati et al., 2003). Moreover, the viral proteins Tat and Rev were found to localize in the nucleolus. The nucleolar localization of these two proteins as well as the trafficking of several viral transcripts through the nucleolus is necessary for viral replication (Michienzi et al., 2000; Michienzi et al., 2006; Michienzi et al., 2002). Furthermore, Gag polyproteins were shown to traffic through the nucleolus, indicating the possible implication of this sub-compartment in HIV-1 RNA assembly and packaging (Lochmann et al., 2013). It has been recently demonstrated that the HIV-1 viral infection down regulates genes associated with the nucleolus, particularly those implicated in ribosome biogenesis (Kleinman et al., 2014). Altogether, these observations indicate a link between HIV-1 replication and the nucleolus. As Rrp17p is implicated in the 5'-end maturation of the 60S subunit rRNAs and accompanies the 60S subunit from the nucleolus to the nuclear periphery it would not be surprising that hNoL12 interaction with NCp7 can affect the ribosome maturation process, revealing a new link between nucleolus and viral infection.

In this study we also demonstrated that hNoL12 is a 5'-3'-exoribonuclease. The implication of exonucleases in viruses replication has been previously reported for the miRNA mir-122, a liver specific miRNA, that promotes the viral life cycle by protecting the HCV (hepatitis C

virus) RNA from degradation by the major cytoplasmic 5'-3'-exoribonuclease Xrn1 (Thibault et al., 2015). Similarly, the incomplete degradation of the gRNA of dengue virus by Xrn1 resulted in the production of a small non coding flaviviral RNA (sfRNA), which induces cytopathicity and pathogenesis (Chapman et al., 2014). In the nucleus, HIV-1 latency establishment was shown to be linked to microprocessor-mediated transcriptional gene silencing at the HIV promoter implicating the 5'-3'-nuclear-exoribonuclease Xrn2. This process leads to the synthesis of miRNAs that mediate chromatin remodeling and transcriptional repression (Wagschal et al., 2012).

As only a few data are available on hNoL12 functions, the identification of its interaction with NCp7 opens a number of unanswered questions. Indeed, one can wonder if NCp7 has an impact on the exoribonuclease activity of hNoL12 in term of processivity or target selectivity. It would thus be interesting to measure in our *in vitro* assay the impact of NCp7 addition on hNoL12-driven RNA degradation. Moreover, it would be of interest to study the rRNA maturation in cells expressing NCp7 or infected with HIV-1, notably at the step which involves hNoL12 (Sloan et al., 2013). It would also be interesting to determine the impact of NCp7 on mature ribosome production.

Supplementary data

Table S1: Primers sequence used in the Gateway cloning

Mutant Name	Primer Name	Primer sequence (5'-3')
hNoL12 Full length	attB1-hNoL12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12 (1-176)	attB1-hNoL12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12 (176)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGACC TTTTTGCGGCTGTGTGCATG
hNoL12 (1-123)	attB1-hNoL12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12 (123)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAG CCCAGCAGCCGG
hNoL12 (1-96)	attB1-hNoL12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12 (96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGCTTTGCTGTCACC

hNoL12 (97-213)	attB1-hNoL12 (97)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGC AGTATGACCACCCCAACCACACAGTC
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12 (124-213)	attB1-hNoL12 (124)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGA CCCCACCTGAGGGAGGGG
	attB2-hNoL12-stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCC CCGCTGTGCCG
hNoL12 (124-176)	attB1-hNoL12 (124)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGA CCCCACCTGAGGGAGGGG
	attB2-hNoL12 (176)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGACC TTTTTGCGGCTGTGTGCATG
hNoL12 (1-22)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12 (22)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGAAG CTAAGAACGAGCCTCGGCCG
hNoL12 (1-61)	attB1-hNoL12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCAT GGGCCGCAACAAGAAGAAGAAGC
	attB2-hNoL12 (61)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCGA AGCTTCCTCTGCTCCTCTTTCAG
hNoL12 (22-96)	attB1-hNoL12 (22)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGT TCGACGAGGAGAAGAGGCCG
	attB2-hNoL12 (96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGTCTTTGCTGTCACC
hNoL12 (61-96)	attB1-hNoL12 (61)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATG CGGGAGGAGCGCCACCAG
	attB2-hNoL12 (96)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACACC GACTCCGTCTTTGCTGTCACC
hNoL12 (22-61)	attB1-hNoL12 (22)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGT TCGACGAGGAGAAGAGGCCG
	attB2-hNoL12 (61)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCGA AGCTTCCTCTGCTCCTCTTTCAG

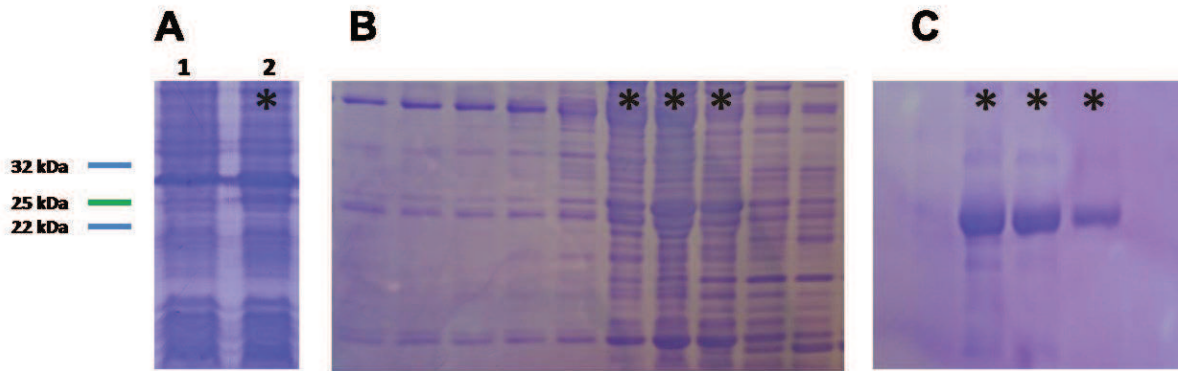
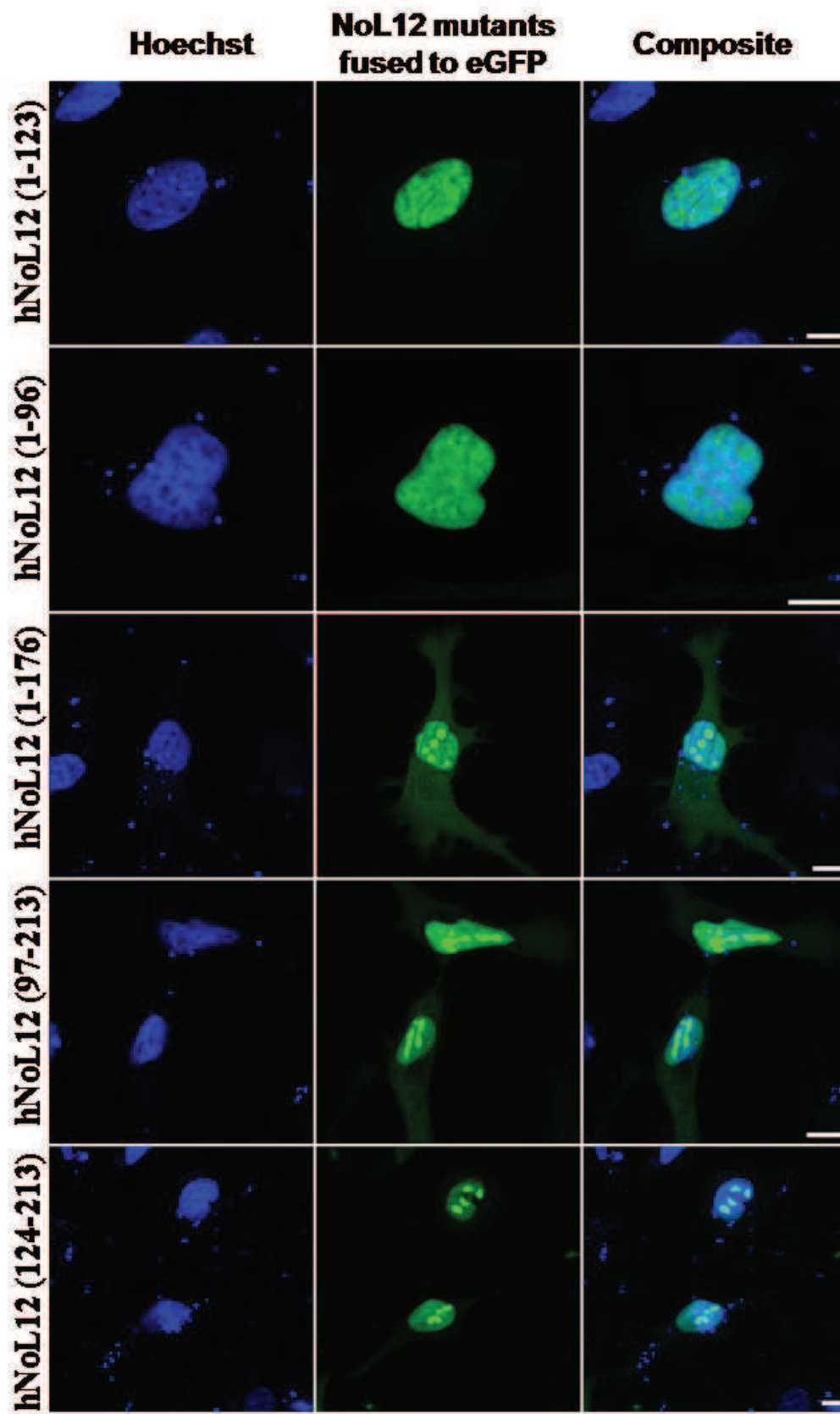


Figure S2: Detection of hNoL12 on SDS-PAGE gel stained with coomassie blue. (A) SDS-PAGE of crude extract of *E. coli* expressing hNoL12 before (Lane 1) and after induction with 1 mM IPTG, Red arrows indicate the band corresponding to hNoL12. (B and C) SDS-PAGE profile of the purified hNoL12 protein fraction obtained after purification with Nickel column (B) and cationic column (C), black asterisks indicate the fractions containing hNoL12.



Figure S3: Alignment of the amino acid sequences of Rrp17p, hNoL12 and Nop25. Identical amino acids were highlighted in yellow. The exoribonuclease catalytic domain is highlighted with a black rectangle.



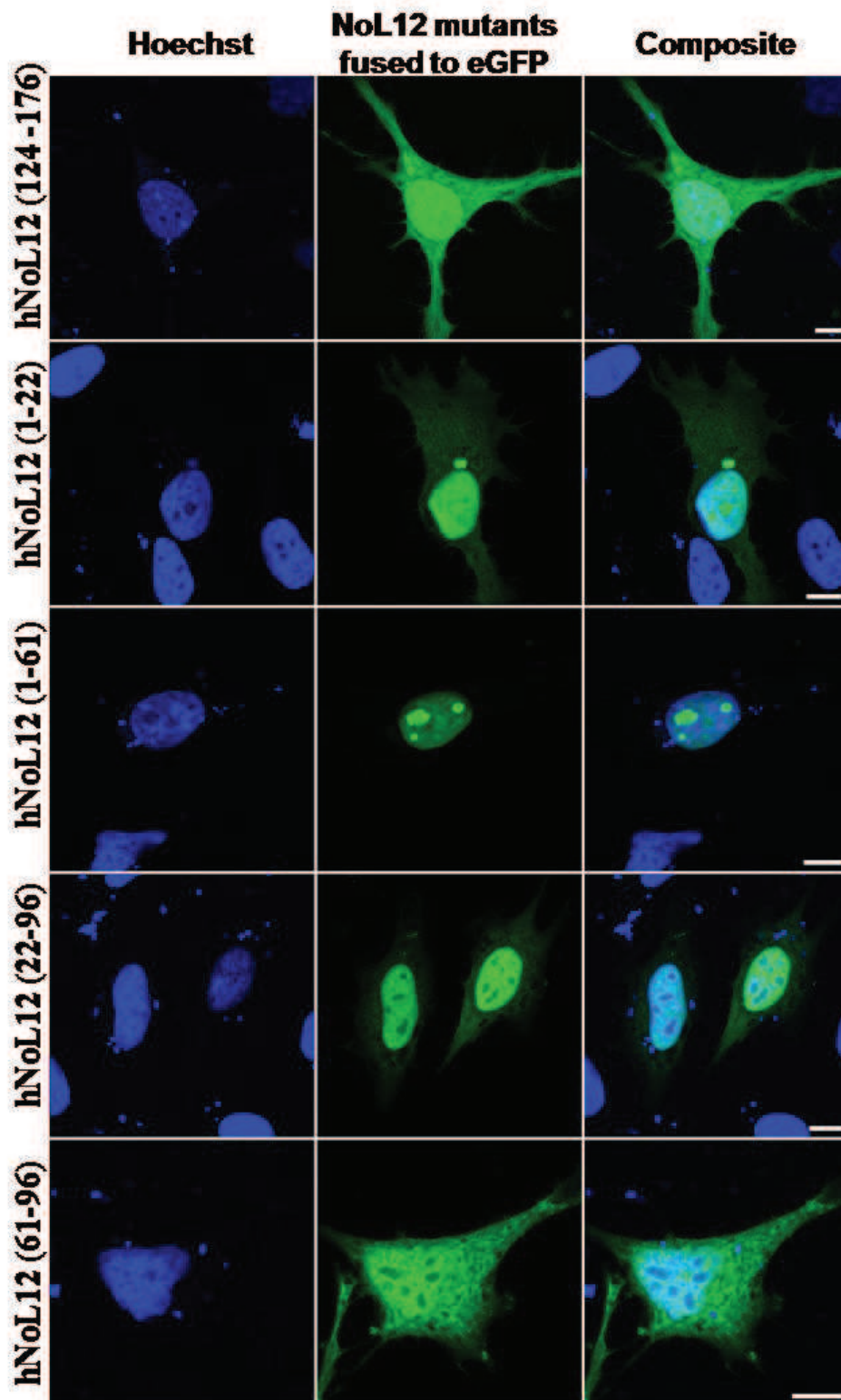


Figure S4: Localization of hNoL12 deletion mutants. HeLa cells were transfected with constructs coding for hNoL12 mutants fused to eGFP and fixed with 4% PFA 24 hours post-transfection. Images were taken by confocal microscopy. The nucleus was stained with Hoechst (Sigma-33258). The scale bar corresponds to 10 μ m.

References

- Anton, H., Taha, N., Boutant, E., Richert, L., Khatter, H., Klaholz, B., Ronde, P., Real, E., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2015). Investigating the cellular distribution and interactions of HIV-1 nucleocapsid protein by quantitative fluorescence microscopy. *PLoS One* *10*, e0116921.
- Azoulay, J., Clamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P., and Mely, Y. (2003). Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *J Mol Biol* *326*, 691-700.
- Banerjee, R., Weidman, M.K., Navarro, S., Comai, L., and Dasgupta, A. (2005). Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J Gen Virol* *86*, 2315-2322.
- Bastiaens, P.I., and Squire, A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol* *9*, 48-52.
- Burnett, A., and Spearman, P. (2007). APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J Virol* *81*, 5000-5013.
- Carteau, S., Gorelick, R.J., and Bushman, F.D. (1999). Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *J Virol* *73*, 6670-6679.
- Chapman, E.G., Moon, S.L., Wilusz, J., and Kieft, J.S. (2014). RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife* *3*, e01892.
- Clamme, J.P., Krishnamoorthy, G., and Mely, Y. (2003). Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* *1617*, 52-61.
- Clever, J., Sasseti, C., and Parslow, T.G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* *69*, 2101-2109.
- Clever, J.L., Miranda, D., Jr., and Parslow, T.G. (2002). RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* *76*, 12381-12387.
- Dannull, J., Surovoy, A., Jung, G., and Moelling, K. (1994). Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues. *EMBO J* *13*, 1525-1533.
- Darlix, J.L., Garrido, J.L., Morellet, N., Mely, Y., and de Rocquigny, H. (2007). Properties, functions, and drug targeting of the multifunctional nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus. *Adv Pharmacol* *55*, 299-346.
- Darlix, J.L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fosse, P., Mauffret, O., and Mely, Y. (2011). Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* *410*, 565-581.
- Darlix, J.L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H., and Roques, B.P. (1995). First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* *254*, 523-537.

- Dove, B.K., Bicknell, K., Brooks, G., Harrison, S., and Hiscox, J.A. (2006). Infectious bronchitis coronavirus induces cell-cycle perturbations. *Adv Exp Med Biol* 581, 357-362.
- El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mely, Y., and de Rocquigny, H. (2015). Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *J Mol Biol* 427, 1480-1494.
- Fujiwara, T., Suzuki, S., Kanno, M., Sugiyama, H., Takahashi, H., and Tanaka, J. (2006). Mapping a nucleolar targeting sequence of an RNA binding nucleolar protein, Nop25. *Exp Cell Res* 312, 1703-1712.
- Galati, D., Paiardini, M., Cervasi, B., Albrecht, H., Bocchino, M., Costantini, A., Montroni, M., Magnani, M., Piedimonte, G., and Silvestri, G. (2003). Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 188, 1483-1491.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Greco, A. (2009). Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* 19, 201-214.
- Hiscox, J.A. (2002). The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* 147, 1077-1089.
- Hiscox, J.A., Whitehouse, A., and Matthews, D.A. (2010). Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* 10, 4077-4086.
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., *et al.* (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 481, 365-370.
- Kleinman, C.L., Doria, M., Orecchini, E., Giuliani, E., Galardi, S., De Jay, N., and Michienzi, A. (2014). HIV-1 infection causes a down-regulation of genes involved in ribosome biogenesis. *PLoS One* 9, e113908.
- Klibanov, S.A., O'Hagan, H.M., and Ljungman, M. (2001). Accumulation of soluble and nucleolar-associated p53 proteins following cellular stress. *J Cell Sci* 114, 1867-1873.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., *et al.* (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Lee, B.M., De Guzman, R.N., Turner, B.G., Tjandra, N., and Summers, M.F. (1998). Dynamical behavior of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* 279, 633-649.
- Lochmann, T.L., Bann, D.V., Ryan, E.P., Beyer, A.R., Mao, A., Cochrane, A., and Parent, L.J. (2013). NC-mediated nucleolar localization of retroviral gag proteins. *Virus Res* 171, 304-318.
- Michienzi, A., Cagnon, L., Bahner, I., and Rossi, J.J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8955-8960.

- Michienzi, A., De Angelis, F.G., Bozzoni, I., and Rossi, J.J. (2006). A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Res Ther* 3, 13.
- Michienzi, A., Li, S., Zaia, J.A., and Rossi, J.J. (2002). A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14047-14052.
- Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L., and Roques, B.P. (1992). Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *EMBO J* 11, 3059-3065.
- Mori, Y., Okabayashi, T., Yamashita, T., Zhao, Z., Wakita, T., Yasui, K., Hasebe, F., Tadano, M., Konishi, E., Moriishi, K., *et al.* (2005). Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol* 79, 3448-3458.
- Oeffinger, M., Zenklusen, D., Ferguson, A., Wei, K.E., El Hage, A., Tollervey, D., Chait, B.T., Singer, R.H., and Rout, M.P. (2009). Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol Cell* 36, 768-781.
- Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., and Benfield, D.A. (1999). The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* 64, 1-12.
- Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G.J., and Watkins, N.J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 200, 577-588.
- Suzuki, S., Fujiwara, T., and Kanno, M. (2007). Nucleolar protein Nop25 is involved in nucleolar architecture. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1114-1119.
- Suzuki, S., Kanno, M., Fujiwara, T., Sugiyama, H., Yokoyama, A., Takahashi, H., and Tanaka, J. (2006). Molecular cloning and characterization of Nop25, a novel nucleolar RNA binding protein, highly conserved in vertebrate species. *Exp Cell Res* 312, 1031-1041.
- Thibault, P.A., Huys, A., Amador-Canizares, Y., Gailius, J.E., Pinel, D.E., and Wilson, J.A. (2015). Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J Virol* 89, 6294-6311.
- Thomas, J.A., Gagliardi, T.D., Alvord, W.G., Lubomirski, M., Bosche, W.J., and Gorelick, R.J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* 353, 41-51.
- Thomas, J.A., and Gorelick, R.J. (2008). Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res* 134, 39-63.
- Tijms, M.A., van der Meer, Y., and Snijder, E.J. (2002). Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 83, 795-800.
- Voss, T.C., Demarco, I.A., and Day, R.N. (2005). Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus. *Biotechniques* 38, 413-424.
- Waggoner, S., and Sarnow, P. (1998). Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* 72, 6699-6709.
- Wagschal, A., Rousset, E., Basavarajaiah, P., Contreras, X., Harwig, A., Laurent-Chabalier, S., Nakamura, M., Chen, X., Zhang, K., Meziane, O., *et al.* (2012). Microprocessor, Setx, Xrn2, and

Rp6 co-operate to induce premature termination of transcription by RNAPII. *Cell* 150, 1147-1157.

- Wang, S.H., Syu, W.J., Huang, K.J., Lei, H.Y., Yao, C.W., King, C.C., and Hu, S.T. (2002). Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 83, 3093-3102.
- Wurm, T., Chen, H., Hodgson, T., Britton, P., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* 75, 9345-9356.
- Yeung, M.L., Houzet, L., Yedavalli, V.S., and Jeang, K.T. (2009). A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *J Biol Chem* 284, 19463-19473.
- You, J., Dove, B.K., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Howell, G., Heinen, P., Zambon, M., and Hiscox, J.A. (2005). Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 86, 3303-3310.
- Zhang, J., and Crumpacker, C.S. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein nuclear localization mediates early viral mRNA expression. *J Virol* 76, 10444-10454.

IV.1.3. Discussions et perspectives

Afin de comprendre l'implication fonctionnelle de la localisation nucléaire et nucléolaire de la NCp7 dans le cycle répliatif du VIH-1, il est crucial d'identifier les protéines cellulaires interagissant avec la NCp7 dans ces compartiments. Nous avons donc recherché de tels partenaires, en analysant plusieurs bases de données portant sur l'identification des protéines cellulaires associées à chacune des protéines du VIH-1 (Jager et al., 2012). Parmi les protéines cellulaires interagissant spécifiquement avec la NCp7 (en absence d'interaction avec NC-Gag), nous avons sélectionné la protéine nucléolaire hNoL12, dont l'implication dans la maturation des ARNs ribosomiaux a été décrite mais reste mal caractérisée à ce jour.

Dans un premier temps, nous avons confirmé l'interaction hNoL12/NCp7 par la technique de FRET-FLIM, par co-immunoprécipitation après surexpression des deux protéines *in cellulo* et par la technique de double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous n'avons pas réussi, pour l'instant, à détecter une interaction entre la protéine NCp7 surexprimée en cellules et la protéine hNoL12 endogène. Ceci peut être expliqué par le fait que les anticorps anti-hNoL12 disponibles ne sont capables de détecter que très médiocrement hNoL12 dans les lysats cellulaires. Ces expériences ayant été réalisées dans un contexte de surexpression de NCp7 dans un système de cellules HeLa, il serait intéressant de confirmer cette interaction dans des lymphocytes T CD4⁺ infectés par le VIH-1, en analysant l'interaction hNoL12/NCp7 par co-IP.

En accord avec les résultats de Jager et al., il est important de souligner qu'aucune interaction en cellules (mesurée par FRET/FLIM ou co-IP) n'a été observée entre Gag et hNoL12 bien que cette interaction soit physiquement possible comme l'atteste les résultats de double-hybride, test dans lequel les deux protéines, fusionnées à un signal de localisation nucléaire, sont forcées à se co-localiser dans le noyau de la levure. L'absence d'interaction hNoL12/Gag s'explique certainement par l'absence de co-localisation entre hNoL12 et Gag dans les cellules. Puisque hNoL12 et NCp7 (Athavale et al., 2010; Fisher et al., 1998) sont des protéines de liaison de l'ARN (Suzuki et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre les deux protéines pourrait être médiée par l'ARN. Cette hypothèse a été confirmée par la perte d'interaction hNoL12/NCp7 (testée par co-IP) lorsque les lysats cellulaires sont traités par la RNase. Deux modèles peuvent donc être proposés pour décrire le rôle de l'ARN dans la liaison entre les deux protéines. Dans un premier modèle, l'interaction hNoL12/NCp7 est supposée indirecte. La co-immunoprécipitation de hNoL12 et NCp7 serait

alors la conséquence de la présence de ces deux protéines sur la même molécule d'ARN sans que les protéines interagissent directement l'une avec l'autre. Dans un deuxième modèle, l'interaction hNoL12/NCp7 est supposée directe. Dans ce cas, l'une, l'autre ou les deux protéines auraient alors besoin de se lier à l'ARN pour adopter une conformation appropriée pour interagir avec l'autre protéine. L'existence d'un FRET entre les deux protéines montre que la distance entre les deux est inférieure à 10 nm, ce qui conforte l'hypothèse d'une interaction directe. Dans ce contexte, il serait intéressant de confirmer cette interaction directe entre les deux protéines par anisotropie de fluorescence, en marquant une des deux protéines de manière covalente à une sonde fluorescente. Une concentration fixe de la protéine marquée pourrait alors être titrée par des concentrations croissantes de l'autre protéine non marquée, en absence ou en présence d'ARN de tailles variables.

Comme NCp7 existe sous sa forme mature dans la phase précoce de l'infection, nous avons choisi d'analyser l'impact de son interaction avec la protéine hNoL12 sur l'infection par des particules pseudovirales non répliquatives mimant les phases précoces de l'infection par le VIH-1. Ces expériences ont été réalisées dans deux conditions, (i) après l'extinction de l'expression de la protéine hNoL12 par transfection transitoire de siRNA contre hNoL12 (ii) après la surexpression de la protéine hNoL12 par transfection transitoire de plasmides codant hNoL12.

Afin d'évaluer le niveau d'infection, nous avons choisi de quantifier l'ARNm codant la luciférase par RT-qPCR et non pas l'activité luciférase elle-même. En effet des contrôles (données non montrées) nous ont confirmés que, l'extinction de hNoL12, comme sa surexpression avaient un impact sur la traduction générale de la cellule.

Après surexpression de la protéine hNoL12, nous n'avons observé aucune variation significative de la quantité d'ARNm de la luciférase. Par contre, l'extinction de l'expression de hNoL12 entraîne une diminution de 40% de la quantité d'ARNm de la luciférase suggérant une potentielle implication fonctionnelle de hNoL12 dans les étapes précoces de l'infection par le VIH-1. L'absence d'effet, après surexpression de hNoL12, peut être expliquée par le fait que la protéine hNoL12 endogène est présente en quantité suffisante pour exercer son rôle dans l'infection. L'effet observé sur l'infection, suite à l'extinction de l'expression de hNoL12, suggère que, soit l'interaction NCp7/hNoL12 est nécessaire pour obtenir une infection efficace ; soit l'extinction de hNoL12 a des conséquences sur la cellule, influençant alors l'infection indépendamment de son interaction avec la NCp7. Pour tenter de répondre à cette question et plus généralement pour évaluer l'impact de hNoL12 sur l'infection, nous

planifions de surexprimer le mutant hNoL12(22-61), qui correspond au domaine d'interaction de hNoL12 avec NCp7, dans les cellules et de regarder sa capacité à inhiber l'infection par le lentivecteur en entrant en compétition, avec hNoL12 endogène, pour NCp7. Par ailleurs, il est important de confirmer l'effet de hNoL12 sur le cycle viral dans le contexte d'un virus VIH-1 sauvage.

Un des aspects particuliers de cette étude est le faible nombre de données disponibles sur les fonctions de hNoL12. Par conséquent, il est nécessaire de caractériser plus en détail cette protéine et ses fonctions cellulaires afin de comprendre l'impact de la NCp7 sur ces dernières. De manière intéressante, la protéine hNoL12 est capable de suppléer à l'absence de Rrp17p chez *S. cerevisiae* suggérant que hNoL12 et Rrp17p possèdent des fonctions communes *in vivo*. Pour cela, la présence d'une activité exonucléase, chez la protéine hNoL12, similaire à celle de Rrp17p, nous apparaissait fortement probable. Afin de tester si cette protéine possède une activité exonucléase, nous avons développé un test *in vitro* basé sur la fluorescence de la 2AP. Nous avons alors montré, pour la première fois, que hNoL12, comme son orthologue Rrp17p, possède une activité exonucléase, Mg²⁺ dépendante, sur les ARNs, mais pas sur un ADN simple brin ou un duplex ARN/ADN. Dans notre test basé sur la fluorescence de la 2AP, la dégradation de l'ARN par hNoL12 se traduit par une augmentation de la fluorescence de la 2AP. Toutefois, l'absence de plateau dans cette augmentation de fluorescence ne nous permet pas de quantifier la vitesse de la dégradation. Pour contourner cette limitation, nous adaptons actuellement ce test à la mesure de l'activité bien paramétrée de la 5'-3'-exoribonucléase Xrn2 (Pellegrini et al., 2008). Ces résultats nous permettront de comparer les activités respectives de Xrn2 et de hNoL12.

Dans un second temps, nous souhaitons tester l'effet de la NCp7 sur l'activité exonucléase de hNoL12 *in vitro* et *in cellulo*. L'étude *in vitro* de cet effet sera réalisée en ajoutant à un ARN, dans le test exonucléase, la NCp7 à différentes concentrations avant ou après l'ajout de hNoL12 et en comparant les cinétiques enzymatiques obtenues. L'étude de l'effet de la NCp7 sur l'activité exonucléase *in cellulo* sera réalisée en étudiant la maturation des ARNr dans des cellules exprimant la NCp7. Nous souhaitons, dans un premier temps, profiter des facilités de manipulation qu'offrent la levure *S.cerevisiae* et des connaissances du Dr.Marlene Oeffinger à Montréal spécialiste de Rrp17p, avec qui nous sommes en contact. Nous surexprimerons la NCp7 dans la levure et regarderons son effet sur les différentes étapes de la maturation des ARNr. L'observation d'un effet dans la levure nous mènera, dans un second temps, à une étude en cellules de mammifères en se basant sur le travail de Sloan et al. sur la maturation

des ARNr en cellules HeLa (Sloan et al., 2013). Dans cette étude, nous nous focaliserons particulièrement sur la maturation de ITS1 et donc le clivage au niveau des sites 2a et 2 (**voir Figure 29**), étapes de la maturation des ARNr dans lesquelles la protéine hNoL12 est impliquée.

Une autre façon d'étudier l'influence de la NCp7 sur la biogénèse des ribosomes est de mettre à profit la forte relation structure/fonction du nucléole. Le nucléole est composé de plusieurs sous-domaines observables par microscopie électronique. On distingue trois compartiments nucléolaires principaux : le centre fibrillaire (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC). Des fonctions spécifiques dans la biogénèse des ribosomes ont été attribuées à chacun de ces domaines. En effet, une activité transcriptionnelle intense de la polymérase I se localise à la jonction entre FC et DFC où les ARNr naissants apparaissent. Le GC est le lieu où différentes étapes de la maturation des pré-ribosomes s'effectuent (Andrew Catalano, 2013). Chacun de ces sous-domaines peut être identifié par des marqueurs protéiques spécifiques comme, par exemple, la grande sous-unité de l'ARN PolI RPA194, la fibrillarine et la nucléophosmine qui sont des marqueurs du FC, DFC et GC, respectivement. La transfection transitoire de ces trois marqueurs en fusion à la protéine photoactivable mEos2 nous permettra d'observer et de localiser ces domaines nucléolaires en utilisant la microscopie à haute résolution (PALM). Nous pourrons alors étudier la co-localisation de la NCp7 et de hNoL12 avec ces différents marqueurs, ce qui nous permettra d'obtenir des informations sur l'implication fonctionnelle de ces protéines dans le nucléole et de mieux comprendre le rôle de leurs interactions.

Comme hNoL12 constitue à notre connaissance le seul partenaire nucléolaire de NCp7 décrit à ce jour, il est important de poursuivre ce travail qui permettra de déchiffrer le rôle de la NCp7 dans le nucléole. Ce déchiffrement pourrait servir de point de départ pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

IV.2.

Etude de la distribution cellulaire de la protéine de nucléocapside NCp7 du VIH-1

IV.2.1. Introduction

IV.2.1.1. Historique de l'imagerie du VIH-1

La première observation, par microscopie électronique, de particules du VIH-1 date de 1983 dans une étude réalisée à l'Institut Pasteur (Barre-Sinoussi et al., 1983; Evans et al., 1988; Levy et al., 1984). Par la suite, la cryomicroscopie électronique et la cryotomographie ont permis l'acquisition d'informations structurales permettant une reconstitution tridimensionnelle des particules virales (Briggs et al., 2006; Schur et al., 2015; Woodward et al., 2015). La microscopie électronique a également permis l'observation des étapes clés du cycle viral comme par exemple la visualisation des synapses virologiques impliquées dans la transmission du VIH-1 entre les cellules infectées et non infectées (Do et al., 2014). Dans la phase précoce, l'observation du génome viral par microscopie électronique, après son marquage par hybridation *in situ*, a permis de déterminer la localisation de complexes ribonucléoprotéiques du VIH-1 défectueux pour l'ADN Flap et l'import nucléaire (Arhel et al., 2006b).

Par la suite, le développement de la microscopie à haute résolution a permis d'éclaircir différentes étapes des phases précoce et tardive du cycle viral. Dans la phase précoce, l'imagerie dynamique appliquée au suivi de particules uniques a rendu possible la première observation, en cellules vivantes, de complexes intracellulaires du VIH-1 après marquage de la protéine virale Vpr par fusion à l'eGFP montrant alors l'implication des microtubules dans le transport du virus vers le noyau (McDonald et al., 2002). Une autre étude utilisant le marquage de l'intégrase par le dérivé de la fluorescéine FIAsh au sein des particules marquées a rendu possible la visualisation des composants structuraux du VIH-1, la morphologie conique de la capsid mature et l'architecture interne de virions. Ces travaux ont également permis de suivre le génome du VIH-1 depuis son entrée jusqu'à l'intégration et d'obtenir des paramètres cinétiques qui montrent que les virus exploitent le réseau de microtubules pour un transport rapide jusqu'au noyau, puis adoptent un mouvement actine-dépendant à proximité du pore nucléaire (Arhel et al., 2006a; Lelek et al., 2012).

Dans la phase tardive, la microscopie à haute résolution s'est avérée très utile pour étudier l'assemblage de la protéine structurale Gag au niveau de la membrane plasmique (Grove, 2014; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009; Malkusch et al., 2013). La microscopie à haute résolution (dSTORM) à deux couleurs a rendu possible la visualisation du recrutement

de la protéine Env au niveau des sites d'assemblage. Ce recrutement est dépendant, à la fois de la partie C-terminale d'Env mais aussi du domaine matrice de Gag (Muranyi et al., 2013). L'étude du bourgeonnement de la particule à la membrane plasmique a été réalisée par microscopie à haute résolution couplée à la microscopie électronique par des méthodes corrélatives mettant en évidence le recrutement des composants du complexe ESCRT-1 à l'intérieur de particules virales naissantes (Prescher et al., 2015; Van Engelenburg et al., 2014).

IV.2.1.2. Imagerie de la NCp7 dans les cellules infectées

IV.2.1.2.1. Intérêt

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés à la protéine de la nucléocapside NCp7 qui est une protéine chaperonne des acides nucléiques présentant des fonctions essentielles dans les phases précoces et tardives du cycle répliatif du VIH-1. Ses implications dans le processus de transcription inverse sont largement documentées (pour revues, voir Darlix et al., 2011; Darlix et al., 1995; Levin et al., 2010; Thomas and Gorelick, 2008). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur le devenir de la NCp7 après la synthèse de l'ADN viral, et sa présence au sein du PIC est controversée car elle n'a jamais été détectée au sein de PIC isolés à partir de cellules infectées (Nermut and Fassati, 2003; Thomas and Gorelick, 2008). Ainsi un de mes projets visait à suivre la NCp7, dans les cellules infectées, en utilisant la microscopie confocale et la microscopie à haute résolution PALM (PhotoActivation Localization Microscopy). Cette étude représenterait la première étude à ce jour portant sur le suivi de particules virales marquées au niveau de la NCp7 et sur le suivi de cette protéine dans les cellules infectées.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec une autre doctorante du laboratoire, Mlle Iryna Lysova, qui adapte actuellement la microscopie PALM à la visualisation de ces particules virales dans les cellules. Une première publication de ce travail est prévue avant la fin de l'année 2016.

IV.2.1.3. Le vecteur lentiviral et le dérivé de la fluorescéine FAsH

Le vecteur lentiviral et le dérivé de la fluorescéine (FAsH) sont les deux principaux outils utilisés dans ce projet. Le protocole de production du vecteur lentiviral et son marquage avec le FAsH sont décrits dans la partie « matériels et méthodes » de ce manuscrit. Je vous décris par la suite ces deux outils.

IV.2.1.3.1. Le vecteur lentiviral

Dans ce travail, nous avons utilisé la deuxième génération de lentivecteurs (Naldini et al., 1996; Pluta and Kacprzak, 2009). Nous avons généré des vecteurs lentiviraux composés de la protéine NCp7 fusionnée en N- ou C-terminal à une étiquette tétracystéine (TC, séquence CCRECC). Nous avons également produit des vecteurs où l'étiquette TC a été introduite en C-terminal de l'intégrase (IN-TC) (Pereira et al., 2011).

Pour les produire, nous avons transfecté des cellules 293T par les 3 plasmides suivants (**Figure 30**) :

- 1- Plasmide d'emballage : code pour les protéines de structure (Gag et Pol) et les deux protéines Tat et Rev. L'expression de ces protéines virales est sous la dépendance du promoteur CMV (Cytomegalovirus). Les gènes accessoires vif, vpr, nef et vpu ont été déletés dans le but d'augmenter la biosécurité du lentivecteur obtenu.
- 2- Le plasmide d'enveloppe : code la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) qui remplace alors les deux glycoprotéines du VIH-1. Le pseudotypage permet au lentivecteur d'adopter le large tropisme du virus VSV et d'infecter des cellules qui ne sont pas une cible naturelle du VIH-1 dont les cellules HeLa utilisées dans nos études (Cronin et al., 2005). Il faut garder en tête que l'entrée du virus se fait alors par endocytose et non par fusion des membranes cellulaires et virales comme pour le VIH-1.
- 3- Le plasmide de transfert : code pour le pseudogénome du lentivecteur. Il contient le gène rapporteur de l'infection (dans notre cas le gène de la luciférase) placé sous le contrôle d'un promoteur CMV ; la séquence d'encapsidation (Psi) du VIH-1 ; le RRE ; les séquences PPT et PPTc. Toutes ces séquences sont comprises entre deux LTR modifiés du VIH-1. Afin d'améliorer la sécurité du lentivecteur, nous avons utilisé un vecteur de transfert « self-inactivating (SIN) » où la région U3 du 5'-LTR est remplacée par un promoteur CMV permettant une transcription indépendante de la protéine virale Tat et où la région U3 du 3'-LTR U3 est déletée de 133pb correspondant à la boîte TATA et les sites de liaison de facteurs de transcription Sp1 et NF-kappaB (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998). La délétion partielle de la région U3 du 3'-LTR est transférée au 5'-LTR après la transcription inverse dans les cellules infectées permettant d'éliminer complètement la possibilité d'une activité transcriptionnelle de l'ADN proviral intégré.

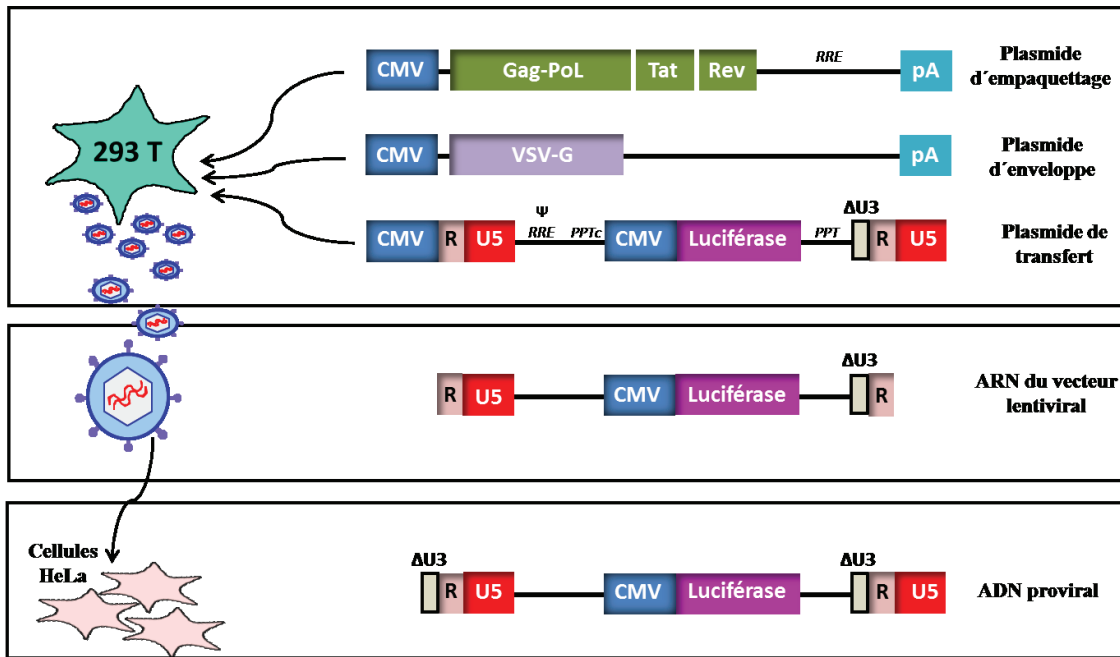


Figure 30: De la production à l'intégration du vecteur lentiviral. (Haut) Les vecteurs lentiviraux sont produits par co-transfection de cellules 293T par les plasmides d'emballage, d'enveloppe et de transfert. Les vecteurs lentiviraux (contenant deux brins d'ARN, cadre du milieu) ainsi générés sont ensuite transduits au sein des cellules HeLa (cadre du bas) où l'ARN est retranscrit en ADN proviral qui s'intègre sous forme d'un provirus.

IV.2.1.3.2. Le dérivé de la fluorescéine (FIAsH)

La technologie de marquage par FIAsH est basée sur la haute affinité de l'arsenic pour les groupements thiols. Le FIAsH est un dérivé de la fluorescéine, modifié pour contenir deux atomes d'arsenic. Il est pratiquement non fluorescent (rendement quantique $< 5.10^{-4}$) lorsqu'il est lié à un agent réducteur comme l'éthanedithiol (EDT) et il devient très fluorescent (rendement quantique = 0,49) quand il se lie à un motif tétracystéine (TC) (Adams et al., 2002; Griffin et al., 1998) (**Figure 31**).

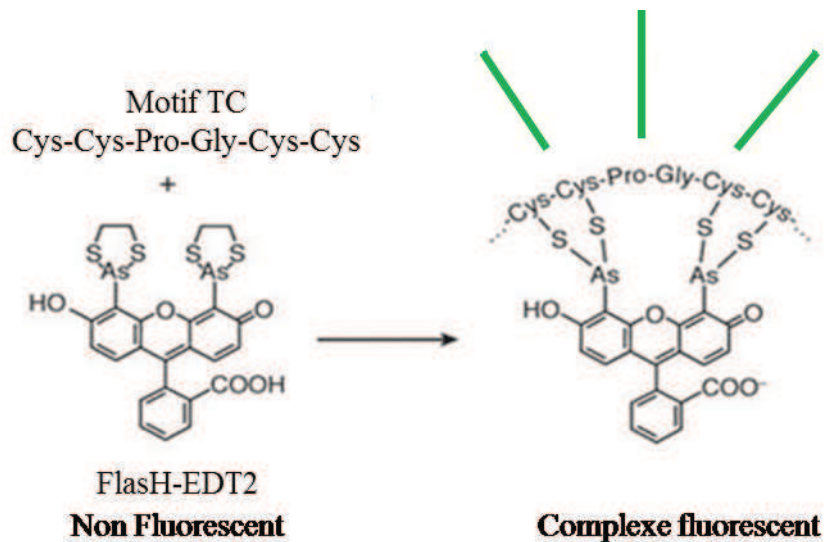


Figure 31: Le dérivé de la fluorescéine FlAsH. Le FlAsH est non fluorescent quand il est lié à l'éthanedithiol (EDT) et devient très fluorescent quand il se lie au motif TC.

Ce système TC-FlAsH offre plusieurs avantages : (i) la petite taille du motif TC (1kDa seulement) altère moins les fonctions biologiques de la protéine marquée que dans le cas de fusions à de grosses protéines fluorescentes comme l'eGFP (27 kDa) (ii) il est compatible avec l'observation des cellules vivantes et fixées (iii) l'affinité du FlAsH pour le motif TC est la même quelle que soit la protéine auquel il est fusionné, contrairement aux anticorps dont l'affinité varie suivant la nature du complexe antigène/anticorps (iv) il ne nécessite pas la perméabilisation des échantillons. Cependant, l'inconvénient majeur de ce système est le marquage non spécifique principalement lié à la liaison du FlAsH à des motifs cystéines des protéines cellulaires (Arhel et al., 2006a; Griffin et al., 1998; Martin et al., 2005).

Il faut noter que deux familles de motifs TC ont été développées : motifs à 6 a.a. ou à 12 a.a. Martin et al ont montré que les motifs à 12 a.a. possèdent une meilleure affinité pour le FlAsH que les motifs à 6 a.a. Cette grande affinité permet d'augmenter le nombre de lavages visant à éliminer le marquage non spécifique sans risque de perdre le signal spécifique (Martin et al., 2005).

IV.2.2. Résultats

IV.2.2.1. Construction, production et contrôle des particules

IV.2.2.1.1. Construction de vecteurs lentiviraux contenant des protéines fusionnées à un motif tétracystéine

Afin de construire les vecteurs lentiviraux contenant des protéines fusionnées au motif TC, nous nous sommes basés sur les travaux de Pereira et al qui ont modifié génétiquement des virus VIH-1 afin de marquer les différentes protéines structurales et enzymatiques par le système TC-FLASH (Pereira et al., 2011). Dans un premier temps, nous avons inséré le motif TC en N- ou C-terminal de la NCp7 dans le plasmide pCMV-dR8.91 utilisé dans la production des pseudovirus (**Figure 32**). Les sites naturels de clivage par la protéase virale ont été préservés en dupliquant les 5 premiers et derniers acides aminés de la séquence codante de la protéine mature (Pereira et al., 2011). Nous avons également utilisé, comme témoin positif d'un transport nucléaire d'une protéine au sein du PIC, des pseudovirus où le motif TC a été introduit en C-terminal de l'intégrase (IN-TC). En effet, le groupe de Pierre Charneau a déjà publié les résultats du suivi, par microscopie à haute résolution, de particules marquées au niveau de l'intégrase; cette dernière restant associée au PIC jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome la cellule hôte (Arhel et al., 2006a; Lelek et al., 2012).

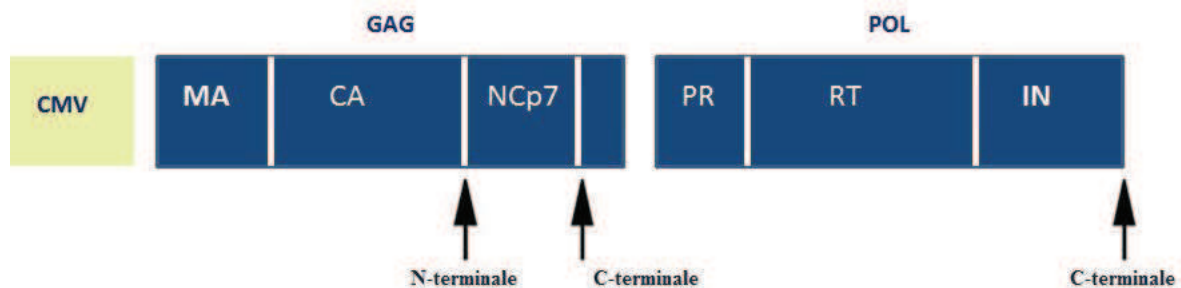


Figure 32: Représentation schématique du plasmide pCMV-dR8.91 modifié. Le motif TC (CCRECC) a été inséré dans trois sites différents, en N- ou C-terminal de la NCp7 ou en C-terminal de l'intégrase.

IV.2.2.1.2. Effet de l'insertion du motif TC sur la production de particules mutées en cellules 293T

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'insertion du motif TC sur la capacité des particules virales à être produites dans des cellules 293T. Le protocole de transfection des cellules productrices est détaillé dans la partie « matériels et méthodes » de ce manuscrit. Les surnageants viraux des lentivecteurs sauvages (WT) ou mutés (NC-TC, IN-TC) ont été

concentrés sur des colonnes Vivaspin pour atteindre le même volume final et la concentration de l'antigène p24 viral a été déterminée par un test ELISA. En comparaison avec les particules WT (**Figure 33**), nous avons observé une diminution de 55% et 50% de la quantité de p24 produite par les cellules 293T dans le cas des particules NC-TC et IN-TC respectivement. Ces résultats suggèrent que l'insertion du motif TC dans le plasmide pCMV-dR8.91 entraîne une diminution de l'ordre de 50% de la capacité de production des particules mutées par les cellules 293T.

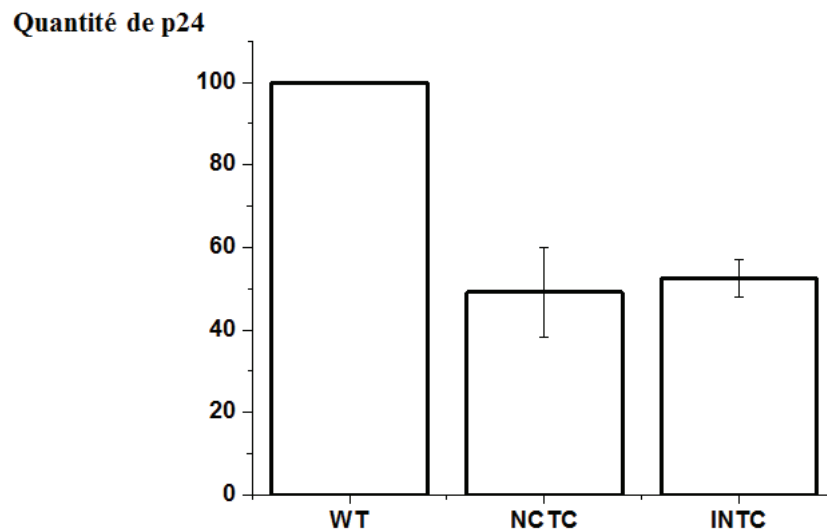


Figure 33: Etude de l'effet de l'insertion du motif TC sur la capacité de la production des particules mutées par les cellules 293T. L'histogramme représente la quantité de p24 pour les différents types de vecteurs lentiviraux normalisée en fixant à 100% la valeur du WT. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

IV.2.2.1.3. Contrôle de l'infectivité des particules virales marquées.

Après production, les vecteurs lentiviraux sauvages (WT) et mutés (NC-TC, TC-NC et IN-TC), ont été marqués par du FLAsH selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Le pouvoir infectieux de ces pseudovirus a été évalué par la mesure de l'activité de la luciférase obtenue 24 h post-infection de cellules HeLa par des surnageants viraux. Les quantités de surnageant utilisées ont été normalisées afin d'utiliser la même quantité d'équivalent p24 pour chaque infection. Les mutants sont tous infectieux bien que présentant un niveau d'infection plus faible que les particules WT (**Figure 34**). Les particules NC-TC ont une infectivité comparable avec celle des particules WT. Par contre nous avons observé une diminution de 50% et de 40% dans le cas des particules IN-TC et TC-NC respectivement. Nous avons donc choisi de travailler, par la suite, avec le pseudovirus contenant la NC

marquée en C-terminal (NC-TC). Ces résultats montrent que l'insertion du TC n'entraîne pas une perte drastique de l'infectivité.

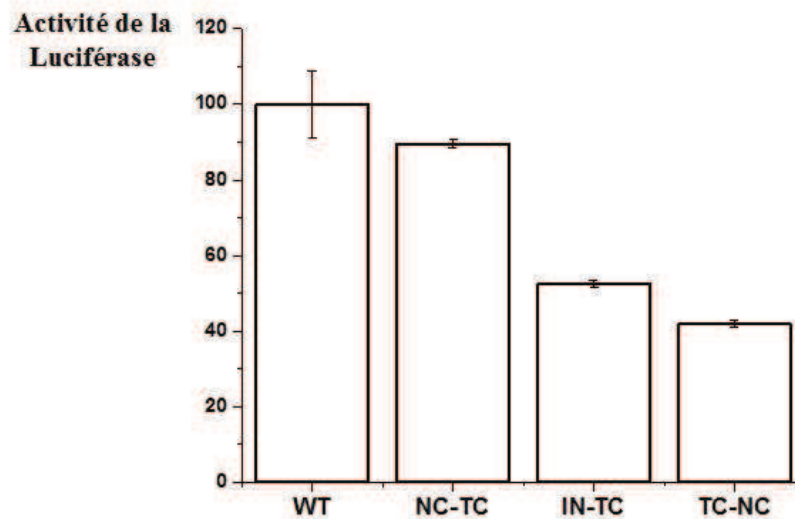


Figure 34: Etude de l'infectivité des vecteurs lentiviraux mutés. Des cellules HeLa ont été infectées par un volume de surnageant équivalent à 60 ng de p24 des lentivecteurs marqués sauvage (WT) ou mutés (NC-TC, IN-TC, TC-NC). Après 24 h d'infection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée par un luminomètre (Berthold, TriStar LB941). L'histogramme représente l'activité de la luciférase pour les différents types de vecteurs lentiviraux normalisée en fixant à 100% la valeur du WT. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

IV.2.2.1.4. Caractérisation de la taille des particules NC-TC marquées au FIASH par microscopie à force atomique

Dans le but de caractériser la taille des particules NC-TC marquées avec du FIASH, nous avons observé ces particules par microscopie à force atomique (AFM).

La **Figure 35A** montre l'image des virus déposés sur une surface de mica, avec une résolution de 1 nm. L'image montre des virus individuels (cercles pointillés blancs) et également quelques agrégats de virus (cercles pointillés rouges). Le profil d'une particule virale typique, schématisé par la ligne blanche sur la **Figure 35A** est montré dans la **Figure 35B**. La hauteur de la particule (et donc son diamètre) est de l'ordre de 80 nm ce qui est comparable avec la taille des particules WT qui est comprise entre 80 et 100 nm (Louise C. Parr-Brownlie, 2015). La largeur apparente de la particule (de l'ordre de 200 nm) est surestimée, ce qui s'explique par le phénomène de convolution engendré par la géométrie de la sonde en interaction avec la surface à imager. Ce phénomène n'entre pas en jeu pour la détermination de la hauteur des objets et nous avons pu, dans ce cas, déterminer le diamètre des virus.

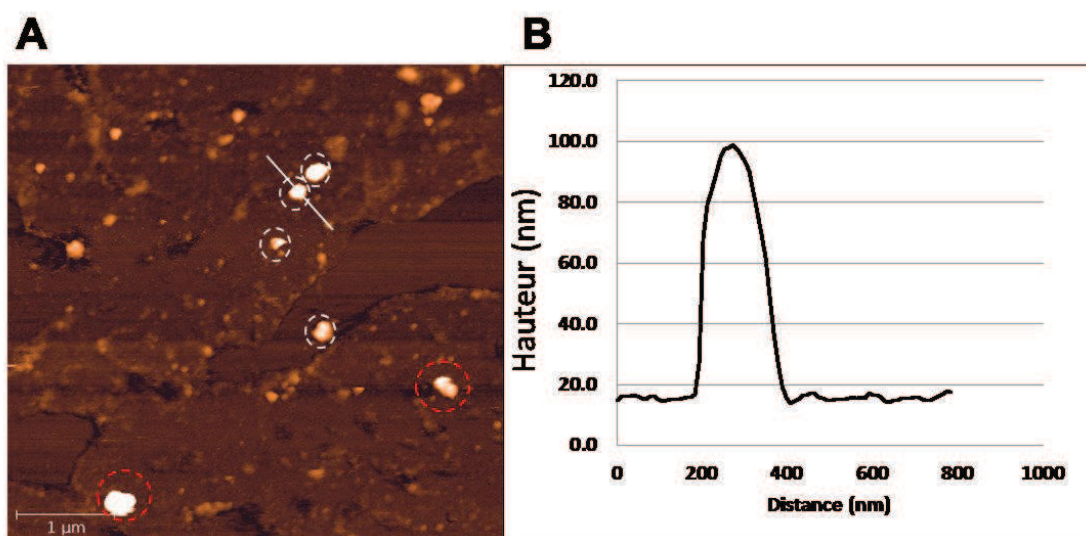


Figure 35: Image AFM des virus NC-TC marqués au FLAsH. (A) Scan 5 x 5 μm de virus déposés sur une surface de mica, les cercles blancs en pointillés localisent les virus, les cercles rouges représentent les agrégats de virus. **(B)** Graphique représentant la hauteur en nm d’une section (correspondant à un virion) représentée par un trait blanc en figure 35A.

Afin de déterminer le diamètre moyen des virus, la distribution de taille d’une population de 337 particules virales a été analysée, révélant un diamètre moyen de 78 ± 2 nm (**Figure 36**).

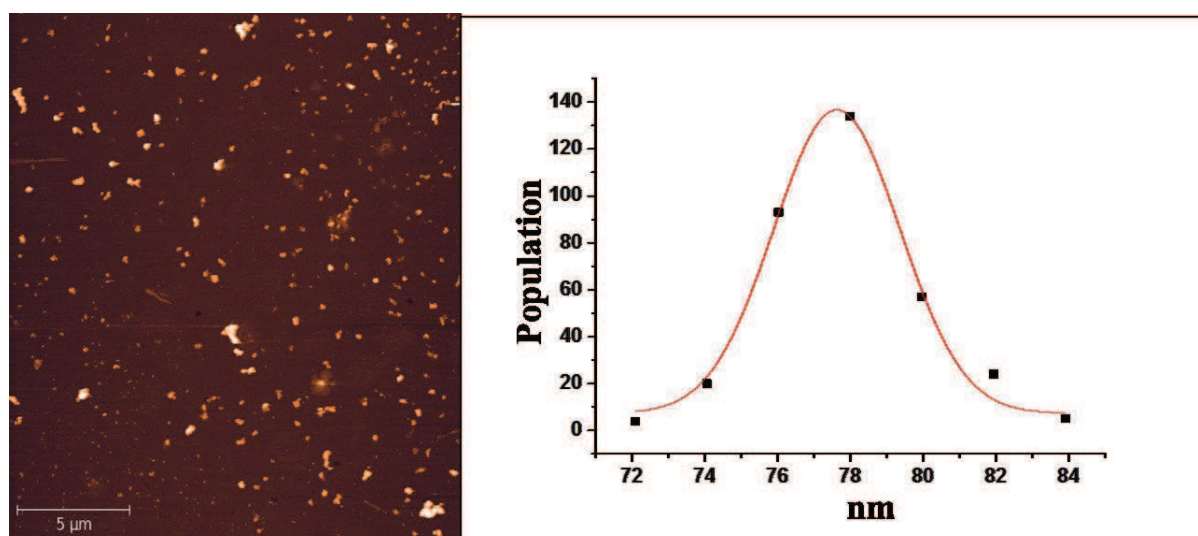


Figure 36 : Image AFM des virus NC-TC marqués au FLAsH. (A) Scan 20x20 μm de virus déposés sur une surface de mica. **(B)** Graphique représentant la distribution en taille (nm) d’une population de 337 virus.

IV.2.2.1.5. Contrôle de l’intégrité des particules

Afin de vérifier l’intégrité des virions produits, nous avons réalisé un double-marquage sur des particules sauvages et mutées, de la NC-TC à l’aide de FLAsH et de la capsidie par un anticorps anti-p24. La colocalisation de la NC-TC et de la capsidie virale a été vérifiée par

microscopie confocale. Les résultats présentés dans la **Figure 37** montrent que le signal du FIAsh est spécifique car seules les particules NC-TC sont marquées (comparer les **Figures 37 A1 et B1**). La présence de la capside est correctement détectée dans les deux préparations WT et NC-TC (**Figure 37, A2 et B2**). En superposant les deux signaux on observe (**Figure 37, A3 et B3**) une colocalisation entre la capside p24 et la NC-TC marquée au FIAsh. Ces expériences de colocalisation ont permis : (i) de confirmer l'intégrité des particules virales marquées avec du FIAsh, en effet 81% des particules qui présente un signal FIAsh sont également marquées au niveau de la capside (ii) de déterminer l'efficacité du marquage FIAsh, nous avons trouvé que 48 % des particules marquées au niveau de la capside sont en même temps marquées par le FIAsh, (iii) de valider la spécificité du marquage FIAsh, qui est prouvée par l'absence du signal FIAsh dans le cas des particules WT .

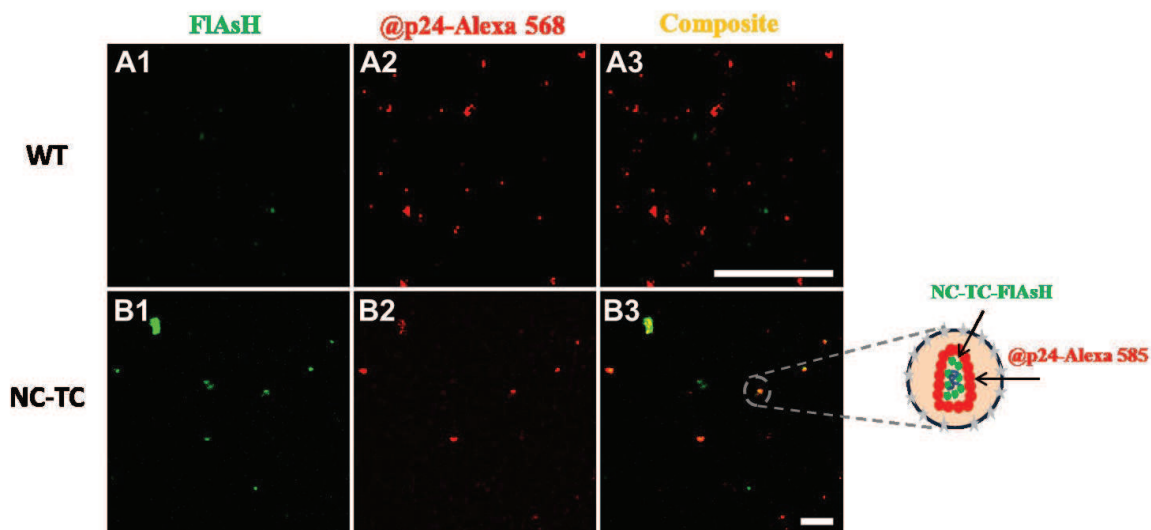


Figure 37: Immunofluorescence anti-p24 sur les pseudovirus marqués au FIAsh. Des particules WT (**A1**) et NC-TC (**B1**) marquées au FIAsh ont été déposées sur des lamelles de verre, préalablement traitées par de la poly-lysine, fixées au PFA 4% et perméabilisées au Triton-X100 1%. La capside virale p24 a été révélée par immunofluorescence en utilisant un anticorps primaire anti-p24 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 568 (**A2 et B2**). **A3 et B3** représentent le composite de A1-A2 et B1-B2, respectivement. Les barres d'échelle représentent 10 μ m.

IV.2.2.2. Microscopie confocale des particules en cellules infectées

IV.2.2.2.1. Observation des particules marquées dans les cellules HeLa par microscopie confocale

Pour observer la distribution des particules virales dans les cellules, nous avons infecté des cellules HeLa par des particules WT, NC-TC ou IN-TC marquées au FIAsh. Deux heures après infection les cellules ont été lavées et l'infection a été poursuivie pendant 6 h. Les cellules ont alors été fixées et observées par microscopie confocale. Dans la **Figure 38**, on

note tout d'abord que le signal observé dans ces conditions est relativement spécifique, comme le montre la différence d'intensité de marquage entre les cellules infectées par les particules NC-TC (A2) ou IN-TC (A3) et celles infectées par le virus sauvage (A1). On observe que les particules NC-TC (A2) et IN-TC (A3) sont distribuées dans le cytoplasme de la cellule et également au niveau du noyau et de la membrane plasmique.

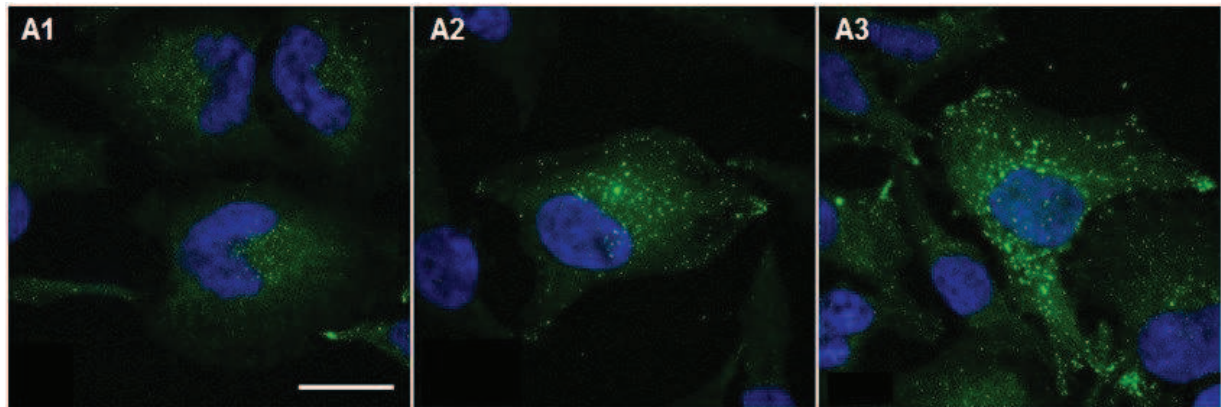


Figure 38: Observation des particules marquées au FIAsh dans les cellules HeLa. 8×10^4 cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles de verre déposées dans une plaque de 12 puits. Après 24 h, les cellules ont été infectées par la même quantité des particules WT (A1), NC-TC (A2) ou IN-TC (A3). Après un temps de contact de 2 h les cellules ont été lavées et l'infection a été poursuivie pendant 6h. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées avec du PFA 4% et le noyau a été marqué avec du Hoechst. La barre d'échelle représente 20 μm .

IV.2.2.2. Etude statistique de la distribution cellulaire des particules NC-TC et IN-TC marquées au FIAsh par microscopie confocale à différents temps post-infection

Afin d'étudier le devenir de la NCp7 après son entrée dans la cellule, nous avons comparé la distribution intracellulaire des particules NC-TC à celle des particules IN-TC. Pour cela, des cellules HeLa ont été infectées par la même quantité de particules NC-TC ou IN-TC marquées au FIAsh et la distribution cellulaire des particules a été analysée à différents temps post-infection (2, 8 et 14 h).

Nous avons développé une application informatique d'analyse d'images (exploitable sous ImageJ) nous permettant de localiser les particules en fonction de leur position relative au noyau. L'analyse a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps les deux canaux vert (FIAsh) et bleu (Hoechst) ont été séparés et l'image du canal « vert » a été utilisée pour faire une sélection manuelle des contours de la cellule en se basant sur l'intensité d'autofluorescence cellulaire (Figure 39A). Le noyau a ensuite été détecté automatiquement sur l'image du canal « bleu ». Par la suite, le logiciel génère des régions d'intérêt correspondant à des sections concentriques de 3 μm d'épaisseur autour du noyau et détecte

automatiquement le nombre de particules présentes dans chacune des sections de la cellule (**Figure 39B**) et calcule ainsi la densité de chacune en particules virales (**Figure 39C**).

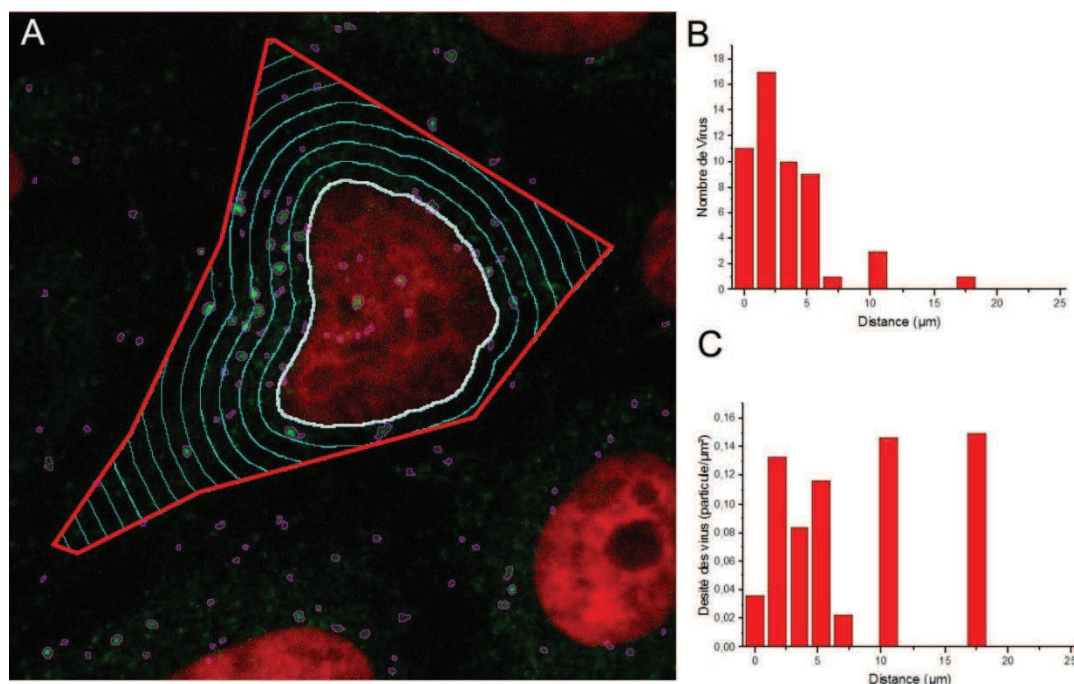


Figure 39: Etude de la distribution cellulaire des particules marquées au FIASH avec le logiciel d'analyse. (A) Représentation schématique d'une cellule HeLa infectée après application du logiciel d'analyse. Les contours de la cellule ont été sélectionnés manuellement en se basant sur l'intensité d'autofluorescence cellulaire. Le noyau a ensuite été détecté automatiquement sur l'image du canal « bleu », le logiciel génère des sections concentriques de 3 μm d'épaisseur autour du noyau et détecte automatiquement le nombre de particules dans chaque section. Les histogrammes représentent le nombre de particules (B) ainsi que la densité des particules (C) en fonction de la distance au noyau. Les cellules infectées ont été fixées et observées au microscope confocal. L'ADN nucléaire a été marqué par du Hoechst. Le Hoechst et le FIASH ont été excités respectivement par des lasers à 405 nm et 488 nm. La fluorescence émise a été collectée entre 415-450 nm dans le canal « bleu » et entre 500-550 nm dans le canal « vert ».

Nous avons par la suite appliqué cette analyse aux différentes conditions d'infection étudiées. Après 2 h d'infection, les particules NC-TC et IN-TC ont des distributions intracellulaires similaires avec une localisation majoritaire au niveau de l'enveloppe nucléaire (45%) (**Figure 40**). Après 8 h, nous avons observé une diminution du pourcentage des particules NC-TC et IN-TC au niveau de l'enveloppe nucléaire (32% et 29% respectivement) qui est associée à une légère augmentation du pourcentage des particules IN-TC dans le noyau (12% au lieu de 10% à 2 h post infection), toutefois aucune augmentation n'a été observée dans le cas des particules NC-TC (**Figure 40**). La localisation nucléaire des particules IN-TC était encore plus prononcée après 14 h d'infection (30% de particules intra-nucléaires) avec un pourcentage constant (environ 30%) de particules observables à la membrane nucléaire. Ceci

suggère que les complexes portant une IN marquée entrent dans le noyau, principalement entre 8 h et 14 h post-infection, et sont visibles dans ce dernier. Les particules virales contenant de la NC-TC marquée, semblent se concentrer à la membrane nucléaire (40% 14 h post-infection) sans être capables d'entrer avec la NC marquée dans le noyau (**Figure 40**). Ces résultats montrent que la proportion des signaux présents dans le noyau à 8 et 14 heures post-infection est significativement plus importante pour les virus marqués sur l'IN que pour ceux marqués au niveau de la NCp7. Ces résultats suggèrent que, soit ; les complexes NC-TC marqués ne peuvent pas entrer dans le noyau ce qui est peu probable car les complexes marqués au niveau de l'IN sont visibles ; soit une grande partie des molécules de NCp7 se dissocient du PIC au cours du transport cytoplasmique et surtout au niveau de la membrane nucléaire rendant les particules entrant dans le noyau non visibles.

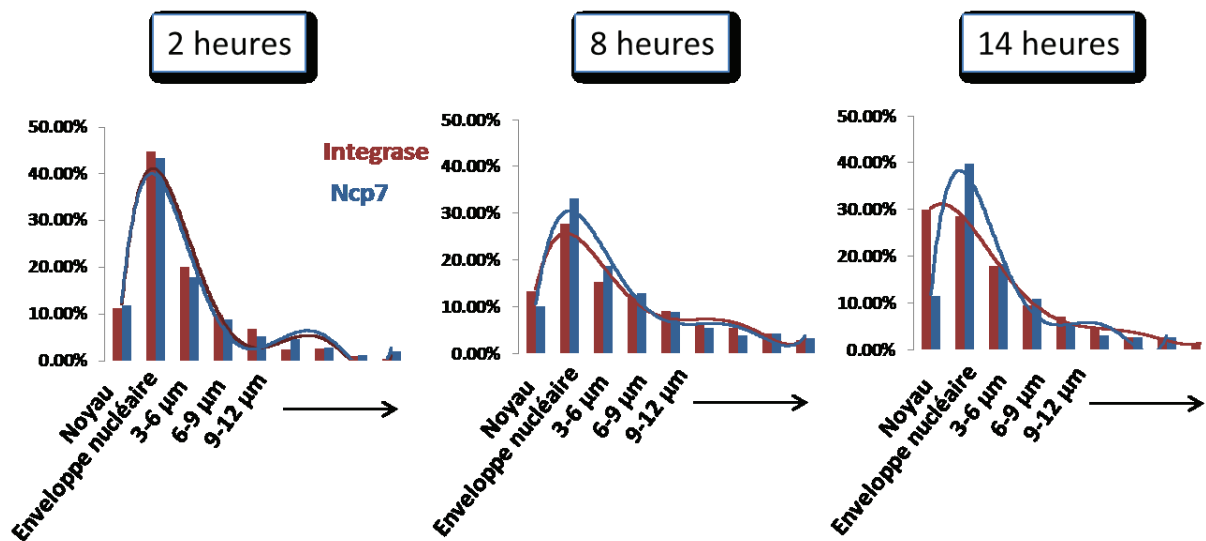


Figure 40: Distribution intracellulaire des particules NC-TC et IN-TC marquées au FIASH. 8×10^4 cellules HeLa ont été étalées sur des lamelles de verre placées dans des plaques de 12 puits. Après 24 h, les cellules ont été infectées par la même quantité de particules (en équivalent p24) NC-TC ou IN-TC. Après un temps de contact de 2 h, les cellules ont été lavées et l'infection poursuivie pendant 2, 8 ou 14 h. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées avec du PFA 4% et observées au microscope confocal. Les images ont été analysées avec le logiciel décrit précédemment. Les histogrammes représentent le pourcentage des particules NC-TC (en bleu) et IN-TC (en rouge) détectées au niveau du noyau, de l'enveloppe nucléaire et dans chacune des sections de 3 µm générées par le logiciel d'analyse.

IV.2.3. Discussions et perspectives

Afin d'étudier le devenir de la NCp7 dans les cellules infectées, nous avons produit des vecteurs lentiviraux composés de la protéine NCp7 fusionnée à un motif tétracystéine. L'insertion du motif TC au sein de la polyprotéine Gag a entraîné une diminution de 50% de la capacité de production des particules mutées (NC-TC et IN-TC) dans des cellules 293T. Par ailleurs, les pseudovirus NC-TC ont conservé un pouvoir infectieux comparable à celui des pseudovirus sauvages. Les virus mutants obtenus conservent alors des capacités de production et d'infection acceptables pour nos études. L'observation des particules NC-TC par microscopie à force atomique a montré que leur taille est comprise entre 80 et 100 nm, ce qui est comparable avec la taille des particules sauvages. L'intégrité des particules virales mutées a été démontrée, en réalisant des co-marquages de la NC-TC, par du FIAsh, et de la protéine de capsid, par immunofluorescence. Ces marquages ont révélés que 81% des particules marquées au FIAsh sur la NC sont co-marquées au niveau de la capsid, confirmant alors l'intégrité des particules. De plus, en supposant que l'efficacité de marquage de la capsid est de 100%, ce résultat nous permet d'affirmer que 48% des particules d'une préparation sont marquées par du FIAsh. Comme l'ensemble des particules portent la NC-TC ou IN-TC, ce résultat évalue l'efficacité minimale du marquage au FIAsh. Comme dans le cas des particules WT, nous n'avons pas observé de colocalisation entre le signal FIAsh et la capsid, nous pouvons affirmer que le marquage au FIAsh est spécifique. De plus, lors de l'infection de cellules HeLa par ces particules, nous avons observé en imagerie confocale, un signal FIAsh dans la cellule beaucoup plus important dans le cas d'une infection par une particule NC-TC que par des particules sauvages marquées. Cela confirme que ce marquage est spécifique mais aussi qu'il est conservé et suffisamment intense pour être observable dans des cellules infectées.

Par la suite, nous avons étudié, par microscopie confocale, la distribution intracellulaire du marquage suite à une infection par des particules marquées sur la NCp7 ou l'intégrase. Afin d'élucider la présence de la NCp7 au sein du PIC ou de mettre en évidence son éventuel relargage cytoplasmique lors de la transcription inverse et/ou du transport vers le noyau, nous avons comparé la distribution intracellulaire des particules NC-TC à celle des particules IN-TC à différents temps post infection. Nos résultats ont montré qu'au cours du temps les signaux NC-TC et IN-TC se rapprochent du noyau. Ils présentent toutefois des profils différents. Alors que le marquage IN-TC a tendance à s'accumuler dans le noyau pour

atteindre 30% à 14 h post-infection, celui de la NC reste constant, pour tous les temps étudiés, à environ 10%. En parallèle, le signal NC-TC à la membrane nucléaire augmente pour atteindre 40% à 14 h post-infection et celui de l'IN est élevé mais ne présente pas d'augmentation.

L'intégrase est la seule protéine virale pour laquelle une association avec le génome viral jusqu'à son intégration est bien établie. Il pourrait paraître surprenant de ne détecter que 30% des particules IN-TC dans le noyau 14 h post infection. Cela peut toutefois être expliqué par le fait que les signaux IN-TC ne soient plus détectables après l'achèvement de l'intégration du PIC. Le même phénomène a déjà été observé par Arhel et al qui ont remarqué une disparition soudaine des signaux intranucléaires (fluorescence FIASH associé à l'intégrase) après l'entrée du PIC dans le noyau (Arhel et al., 2006a). Dans ce contexte, il serait intéressant de faire ces expériences en utilisant un inhibiteur de l'intégrase comme le raltégravir et de regarder si le pourcentage des signaux IN-TC dans le noyau augmente suite à l'inhibition de l'intégration.

L'absence d'augmentation du signal NC-TC dans le noyau peut s'expliquer de différentes façons : (i) soit les complexes marqués n'entrent pas dans le noyau, ce qui est peu probable au vu de la taille de l'étiquette TC et du FIASH mais aussi au vu de l'entrée des virions IN-TC et de l'infectivité des virions NC-TC proche de celle des virions sauvages ; (ii) soit les complexes perdent leur marquage FIASH en conservant leur NC, ce qui de nouveau est peu probable au vu des résultats sur les virions IN-TC ; (iii) soit ils entrent après la perte partielle ou totale des molécules de NCp7 qui lui sont associées et ne sont alors plus visibles avec nos outils. C'est cette dernière hypothèse que nous privilégions. En effet, le FIASH, en lui-même, n'est pas un fluorophore très brillant, il photoblanchit rapidement et nous ne sommes pas dans des conditions qui nous permettent d'observer des signaux faibles et de les distinguer de l'autofluorescence cellulaire. Par ailleurs, l'accumulation de particules à la membrane nucléaire pour les deux types de particules semble suggérer la présence d'une ou plusieurs étapes limitantes à l'entrée du noyau.

Nos résultats sont en accord avec le modèle qui a été récemment proposé par Lyonnais et al dans lequel, en raison de sa faible affinité pour l'ADN double brin par rapport à l'ADN simple brin et l'ARN viral (Lyonnais et al., 2013; Mirambeau et al., 2007), une fraction importante de la NCp7 serait libérée dans le cytoplasme au cours de la synthèse de l'ADN viral par la RT. Dans ce modèle, seule une petite fraction de NCp7 resterait associée au PIC et pourrait ensuite entrer dans le noyau pour participer à l'intégration de l'ADN viral (Buckman

et al., 2003; Carteau et al., 1997; Carteau et al., 1999; Poljak et al., 2003; Thomas et al., 2006). Nos résultats suggèrent par ailleurs, que la perte de la NCp7 est une étape tardive qui se déroule proche du noyau. En accord avec ces résultats, des études par microscopie électronique à balayage ont montré que les protéines de capsid ne sont pas dispersées dans le cytoplasme après l'entrée, mais s'accumulent de manière transitoire à la membrane nucléaire (Arhel et al., 2007). De plus, Lelek et al ont récemment montré, en observant par microscopie à haute résolution des particules du VIH-1 marquées avec du FLAsH au niveau de l'intégrase, qu'une fraction importante du matériel viral dans le cytoplasme reste encapsidé et que l'intégrase ne se « dilue » pas dans le cytoplasme après l'entrée virale mais reste à l'intérieur d'une capsid intacte jusqu'à l'enveloppe nucléaire (Lelek et al., 2012).

Il faut garder en tête que nos résultats ont été obtenus par microscopie confocale. La résolution de ce type de microscopie est limitée par le phénomène de diffraction, à environ 250 nm en direction latérale et 500 nm en direction axiale. Cela signifie que des objets plus petits comme les pseudovirus (environ 100 nm) ne peuvent pas être résolus. Nous sommes aussi limités par la sensibilité de notre microscope qui ne nous permet pas de voir des particules portant très peu de molécules NCp7. Nous savons en effet qu'une particule contient un maximum de 250 molécules d'intégrase et 1500 à 2000 molécules de NCp7 et que des particules marquées sur ces protéines sont visibles dans nos conditions expérimentales. Nous pouvons donc supposer que les particules dans le noyau, invisibles avec le marquage NC-TC, contiennent bien moins de 250 molécules de NCp7 et ont donc perdu plus de 80% de ces molécules.

La limite de résolution peut être dépassée par l'utilisation de techniques de microscopie à haute résolution qui sont capables d'atteindre une résolution de quelques dizaines de nanomètres. Nous avons donc décidé de compléter nos travaux par des observations par microscopie à haute résolution de type PALM, qui permet de visualiser des objets avec une résolution de l'ordre de 30 nm. Le principe de ce microscope est basé sur l'activation, la détection et la localisation séquentielle des fluorophores, ce qui permet ensuite la reconstruction de l'image. L'utilisation de tampons spéciaux contenant des agents réducteurs permettent les passages successifs des fluorophores entre les états brillants et éteints ce qui permet d'améliorer la sensibilité et de visualiser des complexes peu marqués.

L'étude de la distribution intracellulaire de ces deux protéines virales par microscopie à haute résolution nous permettra de savoir si la NCp7 entre ou non dans le noyau et, dans le cas d'une entrée dans le noyau si elle le fait en tant que molécule isolée ou au sein du PIC.

Afin de savoir si la NCp7 est associée au PIC lors de l'entrée de ce dernier dans le noyau, des expériences complémentaires pourront être réalisées. Des cellules HeLa seront infectées par les particules NC-TC marquées avec le FIAsh. L'analyse de la brillance des particules en fonction de leur position par rapport au noyau ou même à l'intérieur du noyau devrait nous donner des informations sur la dissociation des molécules de NCp7 associées au PICs. Ces expériences seront réalisées également par la microscopie à haute résolution PALM.

La présence de la NCp7 au sein du PIC pourra également être mise en évidence en étudiant sa colocalisation avec une autre protéine du PIC, comme l'intégrase, après détection de cette dernière par immunofluorescence. Ces expériences seront réalisées par PALM en deux couleurs avec les échantillons co-marqués (TC/FIAsh pour la NCp7 et immunofluorescence pour l'IN).

L'entrée dans le noyau, de tout ou partie des NCp7 initialement associées au virion, en tant que molécules isolées est fort probable. En effet, une étude récente effectuée dans notre laboratoire, a montré que la NCp7 surexprimée dans des cellules HeLa par transfection transitoire entre dans le noyau et s'accumule dans les nucléoles (Anton et al., 2015). Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser sa voie d'import nucléaire. Plusieurs voies d'entrée pourraient être envisagées : (i) une diffusion passive à travers l'enveloppe nucléaire est possible au vu de la faible taille de la NCp7 (7kDa) (ii) une entrée indépendante de la machinerie cellulaire à travers la membrane nucléaire est possible d'après des études réalisées récemment dans notre laboratoire montrant la capacité de la NCp7 à lier et déstabiliser des bicouches lipidiques de même composition que la membrane nucléaire, (iii) une entrée active par les complexes des pores nucléaires.

Dans le but de distinguer entre ces différentes voies d'import nucléaire, nous étudierons la colocalisation et l'interaction de la NCp7 avec les protéines des pores nucléaires (nucléoporines : Nup). En se basant sur les études de criblages à l'aide des banques d'ARN interférents (Konig et al., 2008; Zhou et al., 2008) et sur les bases de données fondées sur des études d'interaction entre les protéines virales du VIH-1 et les protéines cellulaires (Jager et al., 2012), nous avons sélectionné, en attribuant une priorité aux protéines interagissant avec les protéines du PIC et la NCp7, des protéines des pores nucléaires jouant un rôle dans l'infection par le VIH-1. Parmi celles-ci, Nup153, Nup214, RanBP2, TNPO3, Imp7, Imp α 1 et

Imp α 3. Dans ce contexte, des expériences de FRET-FLIM ou par double hybride chez la levure seront réalisées pour mettre en évidence une interaction entre la NCp7 et ces nucléoporines. L'implication fonctionnelle de ces protéines dans l'import nucléaire de la NCp7 sera étudiée en analysant par microscopie confocale ou à haute résolution la localisation de la NCp7 dans les cellules HeLa dans lesquelles l'expression des protéines cellulaires aura été inhibée par siRNA. Ces études seront réalisées à la fois dans les cellules HeLa surexprimant la NCp7 ainsi que dans des cellules HeLa infectées par les lentivecteurs NC-TC marquées avec du FlAsH. Ensuite, des mutants ponctuels de la NCp7 seront sélectionnés par double hybride inverse chez la levure pour leur perte d'interaction avec les partenaires cellulaires étudiés. La localisation cellulaire de ces mutants sera caractérisée par le même type d'expérience que pour la NCp7 sauvage révélant ainsi l'implication de cette interaction dans la localisation cellulaire de la NCp7.

Si les résultats obtenus par microscopie à haute résolution confirment l'entrée dans le noyau d'une partie de la NCp7 avec le PIC, nous nous intéressons, dans un deuxième temps, au rôle de la NCp7 dans l'import nucléaire du PIC. Pour cela, l'effet des mutations de la NCp7 identifiées précédemment sera évalué sur l'import nucléaire du PIC en générant des lentivecteurs contenant la NCp7 mutée. La localisation du PIC, obtenue par microscopie à haute résolution, dans des cellules infectées par les divers lentivecteurs mutés, en comparaison de celle de PIC sauvages nous permettra d'éclairer le rôle de cette protéine dans l'import nucléaire du PIC.

L'ensemble de ces études nous permettra de mieux comprendre le devenir de la NCp7 dans la cellule infectée qui est sujet à de nombreux questionnements et de fournir des outils pour mettre en évidence de nouvelles pistes thérapeutiques.

IV.3.

Caractérisation des peptides antiviraux ciblant la protéine de la nucléocapside NCp7 du VIH-1

IV.3.1. Introduction

La protéine de la nucléocapside sous ses deux formes, mature (NCp7) ou comme domaine fonctionnel de la polyprotéine Gag (NC-Gag), joue un rôle majeur dans presque chaque étape du cycle viral. L'importance fonctionnelle de cette protéine est illustrée par le fait que des mutations ponctuelles qui perturbent la structure globulaire des doigts de zinc se traduisent par une perte totale du pouvoir infectieux du virus (Sette et al., 2012). Du fait de son implication fonctionnelle multiple ainsi que de la forte conservation de séquence entre différentes souches virales, plusieurs stratégies ont déjà été développées pour cibler la NCp7 dans le développement de nouvelles thérapies antivirales (de Rocquigny et al., 2008; Garg and Torbett, 2014; Mori et al., 2015). Les inhibiteurs les plus populaires sont les éjecteurs de zinc qui éjectent le zinc lié à la NCp7 en solution et dans le virus par oxydation des résidus cystéines de la séquence CCHC et conduisent à une perte complète de l'infectivité virale. Ils offrent de plus l'avantage de ne pas induire de virus résistants (Huang et al., 1998; Miller Jenkins et al., 2010), validant ainsi la pertinence de la NCp7 comme cible pour une thérapie antivirale. Toutefois, bien qu'étant très efficaces, ces éjecteurs de zinc ont une faible spécificité entraînant une toxicité cellulaire assez élevée, de sorte que leur utilisation est principalement envisagée comme microbicide topique pour la prévention de la transmission du VIH (Turpin et al., 2008). En parallèle, plusieurs classes de petites molécules capables de se lier à la NCp7, mais sans aucune activité potentielle d'éjection de zinc, ont été identifiées par des tests basés sur l'inhibition des propriétés chaperonnes de la NCp7 (Breuer et al., 2012; Goudreau et al., 2013; Mori et al., 2011; Mori et al., 2012; Shvadchak et al., 2009). Un certain nombre de ces composés interagissent avec le plateau hydrophobe à la surface des doigts de zinc. Cependant, la plupart d'entre eux montrent une activité antivirale à des concentrations de l'ordre du micromolaire, ce qui suggère que leur structure doit être optimisée pour augmenter leur affinité pour la NCp7.

De petits oligoribonucléotides méthylés semblent être particulièrement prometteurs car ils sont capables d'entraver la réplication du VIH-1 dans les cellules primaires humaines à des concentrations de l'ordre du nano-molaire (Avilov et al., 2012; Grigorov et al., 2011). Cette activité résulte probablement de leur capacité à séquestrer les molécules de NCp7, et donc inhiber les activités chaperonnes de la NCp7 au cours de la transcription inverse.

Enfin, des petits peptides (Dietz et al., 2008; Druillennec et al., 1999; Pustowka et al., 2003) ont été conçus pour entrer en compétition avec la NCp7 pour sa liaison aux ANs. Des peptides

cycliques mimant l'orientation spatiale des résidus Phe16 et Trp37 du plateau hydrophobe ont été conçus. Le peptide le plus actif de cette série, le RB212, a montré sa capacité à entrer en compétition avec la NCp7 pour sa liaison aux ARNs et ADNs viraux *in vitro*. Toutefois, la valeur élevée de son IC50 (concentration donnant 50% d'inhibition) de 30 μM montre que sa structure doit être optimisée afin d'accroître son potentiel antiviral (Druillennec et al., 1999).

Sur le même concept, une série de 63 peptides mimant le plateau hydrophobe de la NCp7, ont été synthétisés et testés dans notre laboratoire pour leur capacité à inhiber *in vitro* la déstabilisation de la séquence cTAR par la NCp7 (donc l'effet chaperonne de la NCp7) en entrant en compétition avec cette dernière dans sa liaison aux ANs (Bernacchi et al., 2002) (**Figure 41**). Plusieurs peptides ont présenté une forte activité, dont le plus actif (PepE) possède une capacité d'inhibition de 100% à une concentration de 1 μM .

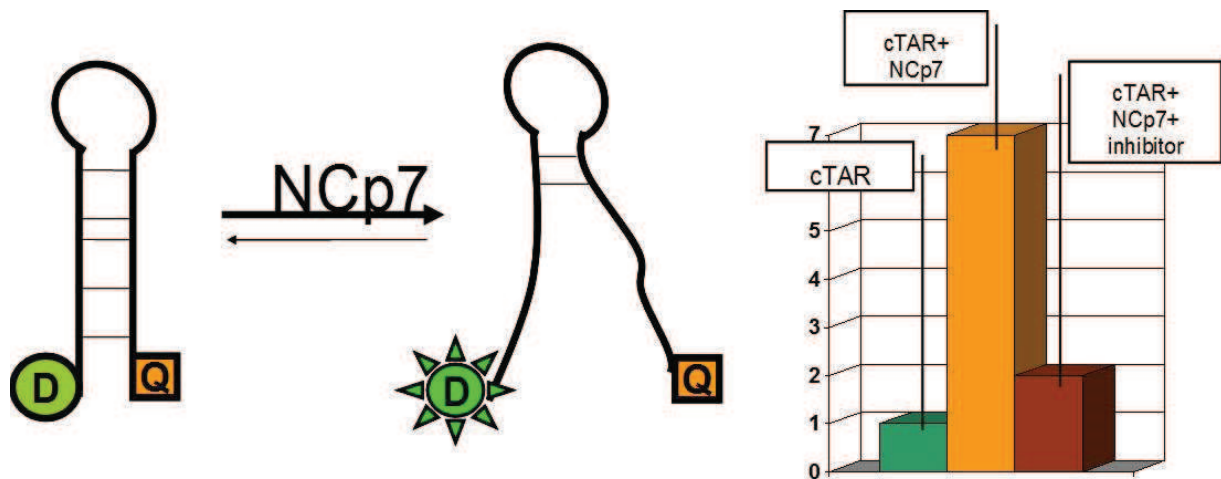


Figure 41: Test de déstabilisation de cTAR. Dans ce test une séquence cTAR marquée à une extrémité avec la rhodamine (D) et à l'autre par un « quencher » de fluorescence (Q) a été synthétisée. En l'absence de la NCp7, cTAR est fermée, et le quencher inhibe la fluorescence de la rhodamine. La déstabilisation de cTAR par la NCp7, augmente la distance entre les deux composés, entraînant une augmentation du signal de fluorescence de la rhodamine. L'ajout des peptides testés au mélange NCp7/cTAR permet d'évaluer leur capacité à inhiber la déstabilisation de cTAR par la NCp7 en comparant la fluorescence observée en présence du peptide à celle en l'absence du peptide.

La conception de peptides anti-viraux utilisables *in vivo* reste toutefois compliquée et soulève un grand nombre de challenges dont le premier est leur vectorisation dans les cellules sous une forme disponible et active. En effet les peptides, souvent polaires ou chargés, sont peu capables de traverser la membrane plasmique cellulaire. Il existe majoritairement trois grandes familles de vecteurs de vectorisation cellulaire : les vecteurs viraux, les systèmes lipidiques et les vecteurs peptidiques (Rawat et al., 2007).

Durant les dix dernières années, un certain nombre de peptides (CPP, Cell Penetrating Peptide) ou petites protéines transductrices (PTD, Protein Transduction Domain), ayant la propriété de traverser la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes ont été utilisés pour vectoriser des macromolécules. Certaines de ces séquences dérivent de protéines naturelles (protéine Tat du VIH-1, protéine Antennapedia de la drosophile ...) ou sont des chimères de plusieurs séquences naturelles (transportan fusion de séquences des neuropeptides galanine et mastoparan ou Pep1 dérivé de l'antigène T de SV40 et de la transcriptase inverse du VIH,..) ou encore des peptides synthétiques (Bechara and Sagan, 2013). Ces systèmes présentent une grande efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo* chez le petit animal toutefois leurs mécanismes d'internalisation ne sont pas toujours clairement établis (Temsamani and Vidal, 2004). Pour délivrer le peptide E dans les cellules, nous avons décidé d'utiliser le vecteur peptidique Pep1. Ce dernier est un peptide amphiphatique de courte séquence connu pour délivrer efficacement sous une forme physiologiquement active, une variété de peptides et de protéines dans différents types de lignées cellulaires (Morris et al., 2001; Munoz-Morris et al., 2007).

L'objectif de mon travail dans ce projet était de (i) développer un protocole permettant une vectorisation efficace de PepE à l'intérieur du cytoplasme des cellules (ii) tester l'activité antivirale de PepE (après sa transduction par Pep1 ou exprimé après transfection transitoire d'un plasmide codant PepE) lors de l'infection de cellules HeLa par un lentivecteur basé sur le VIH-1.

IV.3.2. Résultats

IV.3.2.1. Localisation cellulaire de la Ncp7 et du PepE

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation cellulaire de la NCp7 et du PepE en les surexprimant par transfection transitoire de plasmides codant ces deux peptides en fusion à des protéines fluorescentes. PepE fusionné en N-terminal avec la mRFP, est retrouvé fortement concentré dans le noyau et plus particulièrement dans les nucléoles mais également faiblement dans le cytoplasme (**Figure 42 A2**). Les mêmes localisations sont observées pour le peptide contrôle PepE-minus (même cDNA que le PepE cloné en anti-sens) (**Figure 42 A3**). Les séquences peptidiques sont donc responsables de la localisation nucléolaire de la protéine de fusion car la mRFP, exprimée seule, se répartit de façon homogène dans l'ensemble de la cellule (**Figure 42 A1**).

La NCp7 marquée, aussi bien en fusion N- ou C-terminale par l'eGFP, est localisée dans le cytoplasme et dans les noyaux où elle se concentre au niveau des nucléoles (**Figure 42 B2 et B3**). Comme contrôle, la protéine eGFP exprimée seule est retrouvée répartie de manière homogène dans le cytoplasme et le noyau sans se concentrer dans les nucléoles (**Figure 42 B1**). Nous pouvons donc conclure que la NCp7 relocalise l'eGFP dans le noyau et surtout dans les nucléoles.

La microscopie confocale nous a permis de constater que la NCp7 et les PepE et PepE-minus ont une localisation principalement nucléolaire. Même si le PepE et la NCp7 sont concentrés dans les nucléoles ils sont également retrouvés diffus dans le cytoplasme, où a lieu la transcription inverse, étape ciblée dans le test *in vitro* de développement des peptides antiviraux. Lors d'une co-transfection des plasmides codant les fusions NCp7-eGFP (**Figure 42 C1**) et PepE-mRFP (**Figure 42 C2**), nous observons la co-localisation de ces deux protéines dans le noyau et plus particulièrement dans les nucléoles (**Figure 42 C3**). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une colocalisation entre la NCp7 et le PepE dans un contexte cellulaire.

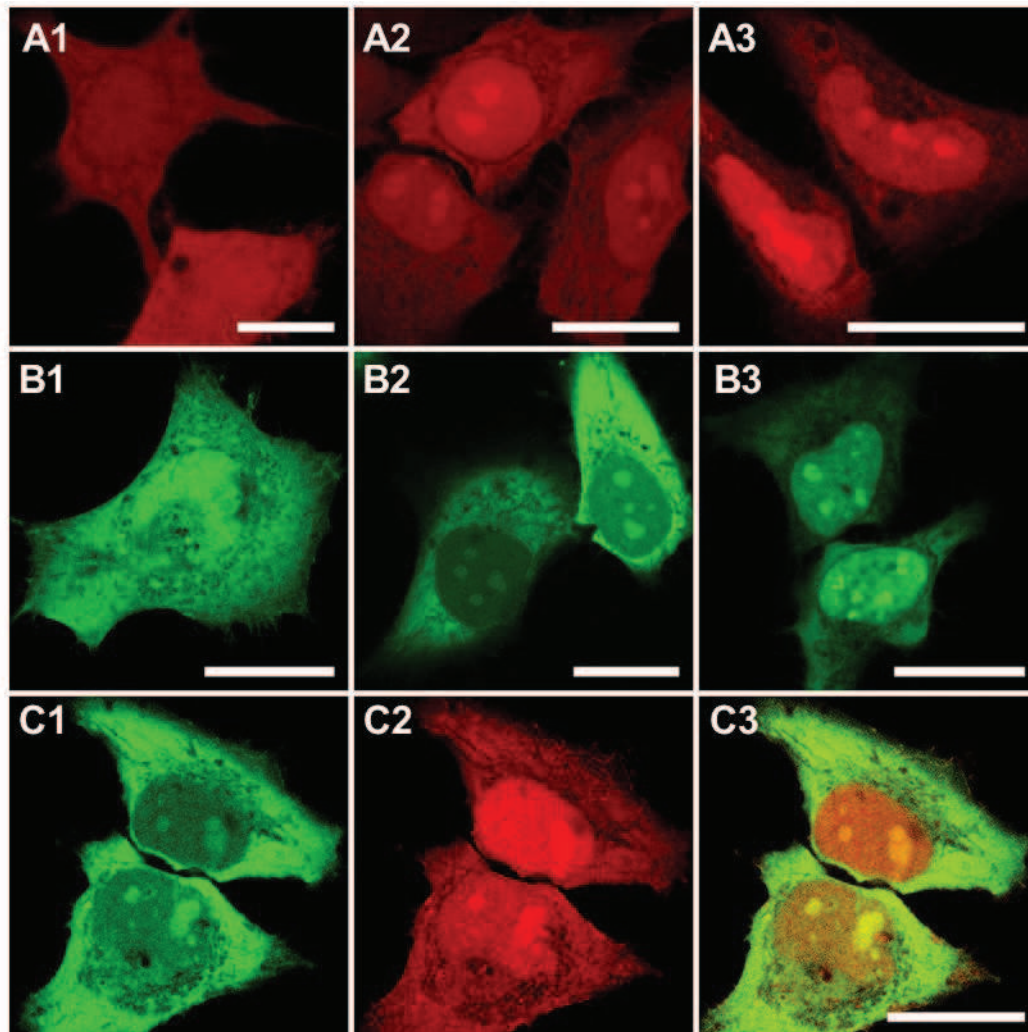


Figure 42 : Etude de la localisation cellulaire de la NCp7 et du PepE. Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codant: mRFP (A1), PepE-mRFP (A2), PepE-minus-mRFP (A3), eGFP (B1), NCp7-eGFP (B2), eGFP-NCp7 (B3) ou co-transfectées par les plasmides pcDNA3.1-NCp7-eGFP (C1) et pcDNA3.1-PepE-mRFP (C2), composite de C1 et C2 (C3). Les barres d'échelle indiquent 20 μ m.

IV.3.2.2. Etude de l'internalisation cellulaire du PepE en présence du vecteur peptidique Pep1

IV.3.2.2.1. Microscopie confocale

Dans un premier temps, nous avons étudié l'internalisation cellulaire de PepE par microscopie confocale. Dans ces expériences, le peptide MP72-Cy3 a été utilisé comme contrôle positif d'internalisation (Kurzawa et al., 2010). PepE et MP72 ont été complexés au Pep1 à différents ratios (1:20, 1:30 et 1:40) selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes » de ce manuscrit. Après une première observation au microscope, nous avons choisi les meilleures ratios, il s'agit du ratio 1:20 pour le peptide MP72 et 1:30 pour PepE.

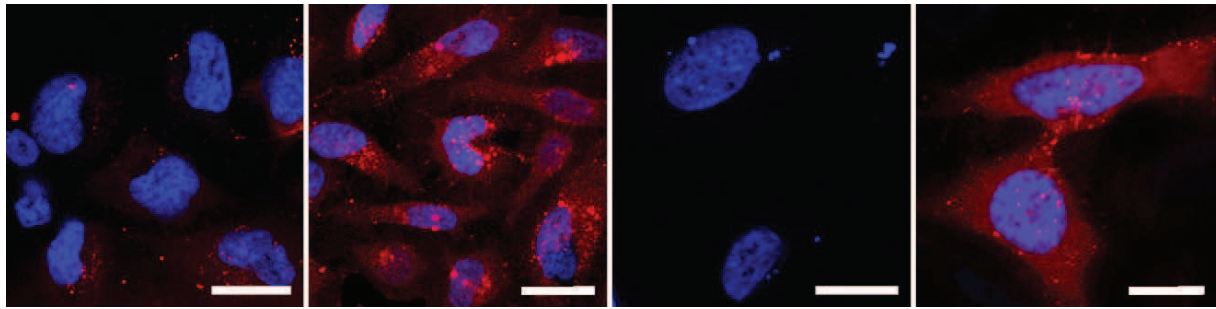


Figure 43: Observation de l'internalisation cellulaire des peptides, PepE-Cy3 et MP72-Cy3, par microscopie confocale. PepE-Cy3 et MP72-Cy3 ont été ajoutés aux cellules HeLa à une concentration de 1 μ M en absence de vecteur peptidique Pep1 (A1 et A3, respectivement) ou complexé à Pep1 à un ratio de 1:30 pour PepE (A2) et 1:20 pour MP72 (A4). Le noyau a été marqué avec du Dapi. Les barres d'échelle représentent 20 μ M.

PepE, est capable d'entrer seul dans les cellules où il est retrouvé dans le cytoplasme sous forme de points (**Figure 43 A1**). Lorsqu'il est associé au vecteur Pep1 on observe une quantité importante de PepE dans la cellule (**Figure 43 A2**), le peptide étant retrouvé sous forme de granules de tailles variables suggérant la présence des peptides dans des endosomes. Nous avons observé également un marquage diffus cytoplasmique suggérant une sortie des endosome et une libération cytoplasmique du peptide.

Le peptide MP72, non complexé, n'est pas capable d'entrer dans les cellules (**Figure 43 A3**). En revanche, associé au Pep1, il est capable d'entrer en grande quantité dans les cellules et est retrouvé localisé sous forme d'amas punctiformes ou diffus dans le cytoplasme (**Figure 43 A4**).

IV.3.2.2.2. Quantification de l'internalisation cellulaire des peptides par cytométrie de flux (CMF)

En parallèle, nous avons confirmé l'internalisation cellulaire des peptides complexés ou non à Pep1 par CMF. Après fixation, les cellules ont été analysées par CMF en observant leur signal Cy3 (**Figure 44**). Un grand nombre de cellules sont retrouvées positives pour la présence de MP72 après vectorisation par Pep1 (82% pour un ratio MP72/Pep1 de 1/20). Cette entrée est largement due à l'action de Pep1 puisqu'en son absence, seulement 2,3% des cellules sont positives. Par ailleurs, la présence de PepE dans les cellules est également fortement augmentée par Pep1 (92% contre 32%). Pep1 permet donc de vectoriser les deux peptides dans la quasi-totalité des cellules ciblées. Ces résultats confirment les observations en microscopie confocale et montrent qu'il est possible d'observer l'internalisation des peptides par CMF.

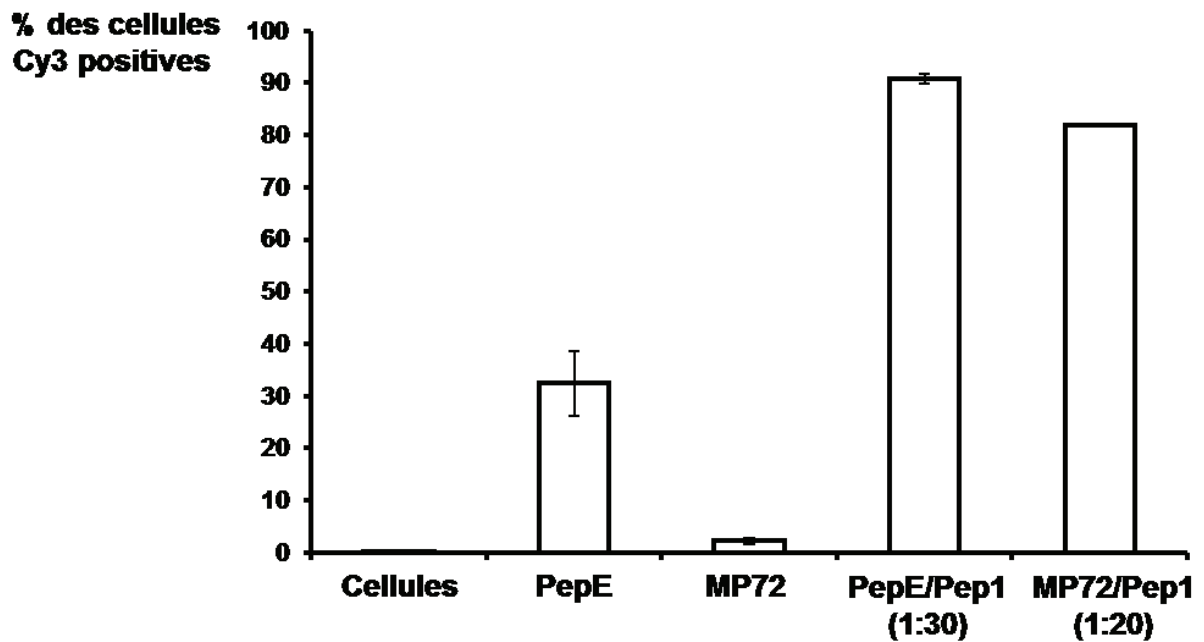


Figure 44 : Quantification de l'internalisation cellulaire des peptides par CMF. Analyse par cytométrie en flux de la proportion de cellules HeLa ayant internalisé les peptides complexés ou non au Pep1. Histogramme présentant le pourcentage de cellules Cy3 positives pour les différentes conditions testées

IV.3.2.3. Pouvoir inhibiteur du PepE sur une infection par un lentivecteur

Après avoir validé l'internalisation de PepE dans les cellules et établi les conditions optimales d'internalisation cellulaire, nous avons testé l'effet inhibiteur de PepE, *in cellulo*, sur une infection par le virus VIH-1. Nous avons utilisé un lentivecteur modèle des étapes précoces d'une infection par le VIH-1. Ce dernier exprime l'eGFP dans les cellules infectées ce qui nous a permis de suivre l'infection par CMF. Ces manipulations ont été réalisées dans deux conditions : i/ soit après entrée par vectorisation du peptide PepE à l'aide de Pep1 (**Figure 45A**) ii/ soit suivant l'expression du peptide après transfection transitoire d'un plasmide codant PepE en fusion à mRFP (**Figure 45B**).

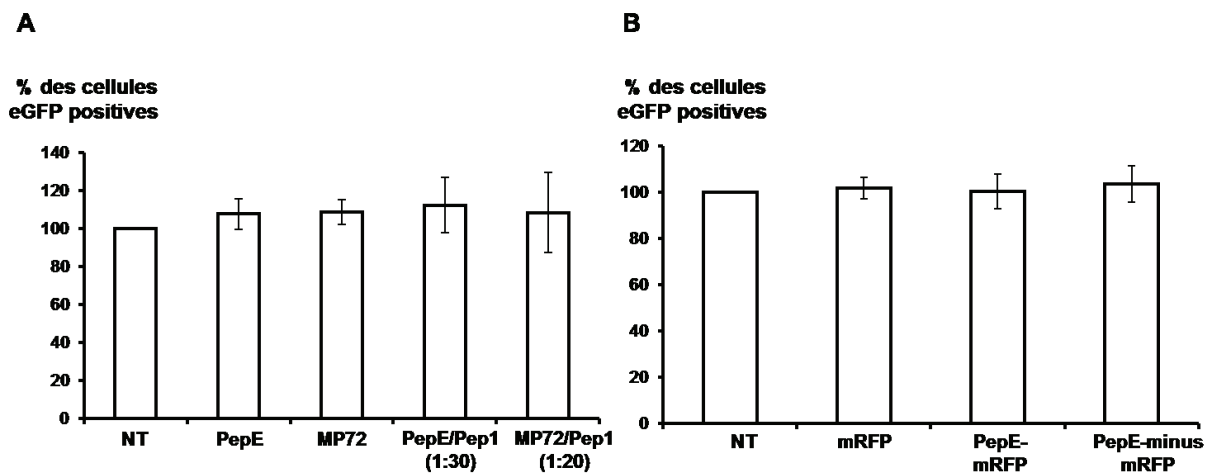


Figure 45: Effet de PepE sur l'infection de cellules HeLa par un lentivecteur codant l'eGFP. 48 h post-infection, le pourcentage de cellules eGFP positives a été déterminé par cytométrie de flux, soit sur des cellules incubées avec PepE ou MP72 complexés ou non avec Pep1 (**A**) ou sur des cellules exprimant PepE après transfection transitoire réalisée 24h avant infection (**B**). Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules eGFP positives pour les différentes conditions normalisées en fixant à 100 % la valeur de la condition non traitée (NT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Dans ces expériences, nous n'avons observé aucun effet inhibiteur de PepE sur l'infection lentivirale qu'il soit vectorisé par Pep1 ou exprimé transitoirement sous forme d'une protéine de fusion avec la mRFP (**Figure 45, A et B**). Afin de s'affranchir d'un potentiel problème d'encombrement stérique lié à la fusion à la mRFP, nous avons également réalisé des transfections par un plasmide codant le PepE seul sans observer d'effets (données non présentées).

Après l'obtention de ces résultats négatifs, nous avons émis l'hypothèse que l'activité antivirale du PepE n'est pas suffisante pour inhiber une forte infection et nous avons alors essayé différents protocoles d'infection en diminuant la quantité de surnageant viral utilisé lors de l'infection et le temps de contact lentivecteur-cellules (2h de contact virus-cellules). Nous avons également fait ces expériences en ajoutant PepE, plusieurs fois après l'infection. Toutefois, nous n'avons dans aucun des cas observé un effet antiviral.

IV.3.3. Discussions et perspectives

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés au développement d'inhibiteurs peptidiques de la NCp7. Nous avons travaillé sur l'optimisation de la vectorisation en cellules, d'un peptide antiviral PepE sélectionné *in vitro* pour sa capacité à inhiber l'action chaperonne de la NCp7 sur la séquence TAR du virus dans le but de tester sa capacité à inhiber une infection par un lentivecteur modèle des phases précoces de l'infection par le VIH-1.

Pour vectoriser PepE dans les cellules, nous avons utilisé un vecteur peptidique Pep1 (Morris et al., 2001). Dans un premier temps, nous avons étudié l'internalisation cellulaire par microscopie confocale. Nos résultats ont montré que PepE est capable d'entrer dans les cellules qu'il soit seul ou associé au Pep1. Dans le premier cas, il est retrouvé dans la cellule sous forme de granules suggérant son accumulation dans les endosomes. Lorsqu'il est associé à Pep1, il a été retrouvé sous forme de granules mais également sous forme diffuse dans le cytoplasme de la cellule suggérant qu'une fraction importante de PepE a été libérée des endosomes ou a traversé la membrane plasmique avec l'aide de Pep1. Ensuite, nous avons confirmé ces résultats par cytométrie en flux. Nos résultats ont montré que le PepE est retrouvé dans les cellules qu'il soit associé (92% des cellules présentent un signal Cy3 positif) ou non à Pep1 (32% des cellules présentent un signal Cy3 positif). Ces résultats confirment les résultats obtenus par microscopie confocale et montrent que l'association avec Pep1 améliore l'internalisation cellulaire de PepE.

Ensuite, nous avons mesuré la capacité de PepE à inhiber une infection de cellules HeLa par un vecteur lentiviral. Ces manipulations ont été réalisées dans deux conditions : i/ soit après entrée de PepE vectorisé à l'aide de Pep1 2h avant l'infection ii/ soit suivant l'expression du peptide après transfection transitoire d'un plasmide codant PepE en fusion à la mRFP 24h avant l'infection des cellules. Au cours de l'ensemble de ces expériences, nous n'avons pas observé d'inhibition d'infection *in cellulo*.

Ces résultats négatifs peuvent être la conséquence d'une livraison incorrecte des peptides après vectorisation ou d'une perte d'activité du PepE lorsqu'il est fusionné à une grosse protéine comme la mRFP (25kDa). Pour cela, nous avons essayé de vectoriser PepE par un autre vecteur peptidique (Kurzawa et al., 2010) et nous avons surexprimé dans les cellules le PepE sans fusion à des protéines fluorescentes sans plus de succès sur l'activité antivirale.

Il est également possible que PepE ne soit pas disponible au lieu et au moment où la NCp7 exerce son activité chaperonne, c'est à dire au cours des étapes précoces du cycle viral pendant lesquelles la NCp7 est protégée par la capsid et, par conséquent, peu ou pas accessible aux peptides. Toutefois, nous avons surexprimé le pepE dans les cellules 293T productrices des lentivecteurs pour permettre son encapsidation dans les particules virales et comparé ensuite le taux d'infection des cellules HeLa par ces particules virales à celui obtenu avec les particules produites en absence du PepE sans observer aucun effet inhibiteur de l'infection virale. En outre, nous avons observé une accumulation des peptides dans les nucléoles. Ainsi, la concentration dans le cytoplasme peut être trop faible pour être actif. De nouvelles stratégies pour améliorer l'internalisation, la livraison et la localisation cytoplasmique du peptide sont actuellement en cours de développement. Nous souhaitons également tester l'activité inhibitrice de PepE sur un virus VIH-1 sauvage pour regarder son effet sur les phases précoce et tardives du cycle viral.

V. Conclusion générale

La protéine de la nucléocapside du VIH-1 joue un rôle important dans les phases précoces et tardives du cycle viral. Le rôle crucial de cette protéine est principalement lié à ses propriétés chaperonnes permettant le réarrangement des acides nucléiques dans leur conformation la plus stable thermodynamiquement. Dans les phases précoces, sous sa forme mature, NCp7 régule plusieurs étapes de la transcription inverse, protège l'ARN viral des nucléases cellulaires et participe probablement, dans le noyau, au processus d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Dans les phases tardives, le domaine NC de Gag joue un rôle dans l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral au cours de l'assemblage et du bourgeonnement de nouvelles particules.

Pendant les six premiers mois de ma thèse, j'ai travaillé sur un projet, qui avait débuté pendant mon stage de master II, portant sur la vectorisation et la caractérisation des propriétés antivirales en milieu cellulaire, d'un peptide PepE sélectionné *in vitro* pour sa capacité à inhiber l'action chaperonne de la NCp7 sur la séquence TAR.

Plusieurs stratégies de vectorisation de peptide existent et nous avons choisi d'utiliser des peptides capables de vectoriser d'autres peptides en formant des complexes avec ces derniers. Nous avons, dans un premier temps, mis au point un protocole permettant l'internalisation efficace des peptides puis nous avons testé l'efficacité anti-virale du PepE, malgré de nombreux essais suivant divers protocoles dans l'ensemble de ces expériences, nous n'avons pas observé d'inhibition de l'infection *in cellulo*.

Après ces résultats négatifs, nous avons réalisé plusieurs essais visant à améliorer la vectorisation (essai d'un autre vecteur peptidique Cady-2, vectorisation de PepE par électroporation, transfection du PepE non fusionné à la mRFP) et le protocole d'infection (diminution de la quantité de surnageant viral et du temps de contact virus-cellules). Toutefois, aucun effet inhibiteur n'a été observé sur l'infection lentivirale. Ces résultats négatifs peuvent être la conséquence d'une vectorisation inefficace (en terme de forme, localisation, quantité...) de PepE dans les cellules ou d'une instabilité de PepE dans les cellules. L'absence d'un effet inhibiteur peut être également expliquée par une quantité insuffisante de PepE dans les cellules, ce qui est peu probable étant donné qu'aucun effet n'a été observé après surexpression du peptide par transfection transitoire. Il est également possible que la déstabilisation de cTAR par la NCp7 ne soit pas une étape suffisamment indispensable au virus pour que son inhibition soit suffisante pour inhiber l'infection. Cette hypothèse est peu probable étant donné que plusieurs molécules chimiques, sélectionnées au

laboratoire par le même test *in vitro*, ont montré une capacité d'inhibition de l'infection à des concentrations inhibitrices 50 de l'ordre du micromolaire. L'absence d'activité de PepE étant certainement liée à une accumulation des différents problèmes mentionnés ci-dessus, nous avons décidé d'arrêter ce projet et entamé deux projets en parallèle tous les deux centrés sur la NCp7 sous sa forme mature.

Ces deux projets nous ont permis de retracer le parcours de la NCp7 dans les cellules. Les études de la distribution intracellulaire de la NCp7 par microscopie confocale dans les cellules infectées ont montré que cette protéine s'accumule dans l'espace péri-nucléaire et il faut noter que la NCp7 n'a pas été détectée dans le noyau. Par ailleurs, nous savons que les particules IN-TC entrent dans le noyau et que les particules NC-TC présentent un pouvoir infectieux proche de celui des particules sauvages ce qui signifie qu'elles entrent dans le noyau pour y intégrer leur ADN. Ces résultats suggèrent fortement que tout ou partie de la NCp7 quitte les particules dans le cytoplasme, certainement à proximité de la membrane nucléaire, les rendant invisibles dans le noyau avec nos outils. En effet, le FIAsh, en lui-même, n'est pas un fluorophore très brillant et il se photoblanchit rapidement et nous ne sommes pas dans des conditions qui nous permettent de distinguer entre les signaux faibles et l'autofluorescence cellulaire. De plus, il ne faut pas oublier que ces expériences ont été réalisées par microscopie confocale dont la limite de résolution est de 250 nm ce qui veut dire que tout objet ayant une taille inférieure à 250 nm n'est pas bien résolu.

Pour contourner ces problèmes, des expériences de microscopie à haute résolution (PALM) sont en cours de réalisation par une autre étudiante en thèse dans notre laboratoire. Les premiers résultats obtenus par PALM montrent que les particules NC-TC sont, comme les, particules IN-TC, visibles dans le noyau.

Par la suite du projet, nous voudrions confirmer par microscopie à haute résolution la dissociation de la NCp7 dans le cytoplasme. La dissociation de la NCp7 se traduisant par une diminution de la brillance des particules, il est intéressant d'étudier la brillance de ces dernières à différents temps post infection et en fonction de leur localisation par rapport au noyau. Si les résultats obtenus par haute résolution confirment les hypothèses réalisées à partir des observations en microscopie confocale, il serait intéressant d'analyser le mécanisme impliqué dans ce phénomène. Un modèle a récemment été proposé par l'équipe de Gilles Mirambeau (Lyonnais et al., 2013) dans lequel la NCp7, en raison de sa faible affinité pour l'ADN par rapport à l'ARN, quitterait les particules au fur et à mesure de la synthèse de

l'ADN viral et finalement seulement une petite fraction de la NCp7 entrerait avec le PIC dans le noyau pour participer dans l'intégration du génome viral. Il serait intéressant de valider ce phénomène en analysant la brillance des particules après le blocage de la reverse transcription par de l'AZT.

Etant donné que les premiers résultats obtenus par PALM ont permis d'observer la NCp7 dans le noyau, nous voudrions regarder si cette dernière entre dans le noyau en tant que molécule isolée ou associée à des ARNs cellulaires et/ou au sein du PIC. L'association de la NCp7 au PIC sera mise en évidence en étudiant la co-localisation de la NCp7 avec une autre protéine virale présente au sein du PIC comme l'intégrase qui sera marquée par immunofluorescence ou en étudiant sa co-localisation avec l'ADN viral après marquage de ce dernier par hybridation in situ.

Dans un contexte de surexpression, nous avons trouvé que la protéine NCp7 se localise majoritairement dans les nucléoles ou elle interagissait avec la protéine nucléolaire hNoL12. Nous avons confirmé cette interaction et identifié le domaine d'interaction de hNoL12 avec Ncp7 par différentes techniques (co-IP, FRET-FLIM et double hybride chez la levure) et nous avons montré que l'extinction de l'expression de la protéine hNoL12 entraîne une diminution de l'infection par un vecteur lentiviral soulignant l'implication fonctionnelle de cette protéine dans les phases précoces du cycle viral.

Nous avons observé un effet de hNoL12 sur les phases précoces mais nous n'arrivons pas à expliquer comment cette protéine exerce cet effet et exactement sur quelles étapes du cycle viral elle agit. Etant donné que cette protéine possède une activité exoribonucléase, qu'elle interagissait avec la protéine NCp7 qui joue un rôle bien caractérisé dans l'étape de la reverse transcription et que nos expériences d'immunofluorescence contre la protéine endogène hNoL12 ont permis de détecter cette dernière dans le cytoplasme. Il nous paraît raisonnable de regarder si hNoL12 a un impact sur l'étape de la reverse transcription.

Il ne faut pas oublier que la localisation nucléolaire de la NCp7 a été uniquement observée dans un contexte de surexpression. Afin d'éliminer la possibilité que cette localisation soit artefactuelle suite à la surexpression. Nous voudrions étudier par la microscopie à haute résolution la co-localisation de la NC-TC dans un contexte d'infection avec les nucléoles en utilisant des marqueurs nucléolaires comme, par exemple, la grande sous-unité de l'ARN PolII RPA194, la fibrillarine et la nucléophosmine qui sont des marqueurs du centre fibrillaire CF, le composant fibrillaire dense DFC et le composant granulaire (GC) respectivement. Ces

expériences nous permettront de confirmer la localisation nucléolaire de la NCp7 observée dans le contexte d'une surexpression et de la localiser précisément dans les compartiments nucléolaires et de confirmer dans un deuxième temps sa colocalisation avec hNoL12 dans le contexte d'une infection par le VIH-1.

Ces deux projets qui semblent séparés ont pour objectif commun d'approfondir nos connaissances sur le comportement de la protéine NCp7 dans les cellules infectées, chacun de ces projets apportant des résultats utiles pour l'autre. Une meilleure compréhension du devenir de la NCp7 dans les cellules infectées est une condition préalable à la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels cette protéine est impliquée dans le cycle viral du VIH-1 dont le rôle est aujourd'hui encore non totalement caractérisé. La connaissance de ces mécanismes nous permettra certainement de mettre en évidence de nouvelles pistes thérapeutiques.

VI. Références

- Abbas, W., and Herbein, G. (2014). Plasma membrane signaling in HIV-1 infection. *Biochimica et biophysica acta 1838*, 1132-1142.
- Abbink, T.E., and Berkhout, B. (2003). A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon. *The Journal of biological chemistry 278*, 11601-11611.
- Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R.Y. (2002). New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *Journal of the American Chemical Society 124*, 6063-6076.
- Adamson, C.S., and Freed, E.O. (2008). Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance. *Drug discovery today 13*, 424-432.
- Aldovini, A., and Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *Journal of virology 64*, 1920-1926.
- Alfadhli, A., Dhenub, T.C., Still, A., and Barklis, E. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. *Journal of virology 79*, 14498-14506.
- Alfadhli, A., McNett, H., Tsagli, S., Bachinger, H.P., Peyton, D.H., and Barklis, E. (2011). HIV-1 matrix protein binding to RNA. *Journal of molecular biology 410*, 653-666.
- Alice Sosic, F.F., Elisa Perissutti, Laura Sinigaglia, Vincenzo Santagada, Giuseppe Caliendo, Elisa Magli, Antonio Ciano, Giuseppe Zagotto, Cristina Parolinc and Barbara Gatto (2013). Design, synthesis and biological evaluation of TAR and cTAR binders as HIV-1 nucleocapsid inhibitors. *MedChemComm 4*, 1388-1393.
- Allain, B., Lapadat-Tapolosky, M., Berlioz, C., and Darlix, J.L. (1994). Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome. *The EMBO journal 13*, 973-981.
- Aloia, R.C., Tian, H., and Jensen, F.C. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90*, 5181-5185.
- Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., and Summers, M.F. (2000). NMR structure of stem-loop SL2 of the HIV-1 psi RNA packaging signal reveals a novel A-U-A base-triple platform. *Journal of molecular biology 299*, 145-156.
- Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D., and Summers, M.F. (2001). Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *Journal of molecular biology 314*, 961-970.
- Ambrose, Z., and Aiken, C. (2014). HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology 454-455*, 371-379.
- Anastassopoulou, C.G., and Kostrikis, L.G. (2006). Global genetic variation of HIV-1 infection. *Current HIV research 4*, 365-373.
- Andrew Catalano, D.H.O.D. (2013). *Proteins of the Nucleolus: Regulation, Translocation, & Biomedical Functions*.

- Anton, H., Taha, N., Boutant, E., Richert, L., Khatter, H., Klaholz, B., Ronde, P., Real, E., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2015). Investigating the cellular distribution and interactions of HIV-1 nucleocapsid protein by quantitative fluorescence microscopy. *PLoS one* *10*, e0116921.
- Ao, Z., Danappa Jayappa, K., Wang, B., Zheng, Y., Kung, S., Rassart, E., Depping, R., Kohler, M., Cohen, E.A., and Yao, X. (2010). Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *Journal of virology* *84*, 8650-8663.
- Ao, Z., Yao, X., and Cohen, E.A. (2004). Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *Journal of virology* *78*, 3170-3177.
- Arfi, V., Lienard, J., Nguyen, X.N., Berger, G., Rigal, D., Darlix, J.L., and Cimarelli, A. (2009). Characterization of the behavior of functional viral genomes during the early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* *83*, 7524-7535.
- Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* *7*, 96.
- Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S., and Charneau, P. (2006a). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nature methods* *3*, 817-824.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., and Charneau, P. (2006b). Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. *Retrovirology* *3*, 38.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M.C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal* *26*, 3025-3037.
- Arts, E.J., and Hazuda, D.J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* *2*, a007161.
- Arts, E.J., Li, Z., and Wainberg, M.A. (1995). Analysis of Primer Extension and the First Template Switch during Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcription. *Journal of biomedical science* *2*, 314-321.
- Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *The Journal of biological chemistry* *273*, 33414-33422.
- Athavale, S.S., Ouyang, W., McPike, M.P., Hudson, B.S., and Borer, P.N. (2010). Effects of the nature and concentration of salt on the interaction of the HIV-1 nucleocapsid protein with SL3 RNA. *Biochemistry* *49*, 3525-3533.
- Auxilien, S., Keith, G., Le Grice, S.F., and Darlix, J.L. (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. *The Journal of biological chemistry* *274*, 4412-4420.
- Avilov, S.V., Boudier, C., Gottikh, M., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2012). Characterization of the inhibition mechanism of HIV-1 nucleocapsid protein chaperone activities by methylated oligoribonucleotides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *56*, 1010-1018.
- Avilov, S.V., Godet, J., Piemont, E., and Mely, Y. (2009). Site-specific characterization of HIV-1 nucleocapsid protein binding to oligonucleotides with two binding sites. *Biochemistry* *48*, 2422-2430.

- Avilov, S.V., Piemont, E., Shvadchak, V., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2008). Probing dynamics of HIV-1 nucleocapsid protein/target hexanucleotide complexes by 2-aminopurine. *Nucleic acids research* 36, 885-896.
- Azoulay, J., Clamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P., and Mely, Y. (2003). Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *Journal of molecular biology* 326, 691-700.
- Bachand, F., Yao, X.J., Hrimech, M., Rougeau, N., and Cohen, E.A. (1999). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *The Journal of biological chemistry* 274, 9083-9091.
- Bacharach, E., Gonsky, J., Alin, K., Orlova, M., and Goff, S.P. (2000). The carboxy-terminal fragment of nucleolin interacts with the nucleocapsid domain of retroviral gag proteins and inhibits virion assembly. *Journal of virology* 74, 11027-11039.
- Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P.A., Hahn, B.H., and Sharp, P.M. (2003). Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300, 1713.
- Barbouche, R., Miquelis, R., Jones, I.M., and Fenouillet, E. (2003). Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. *The Journal of biological chemistry* 278, 3131-3136.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J.L., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1993). Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *Journal of molecular biology* 229, 382-397.
- Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* 587, 1693-1702.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology* 17, 657-700.
- Berglund, J.A., Charpentier, B., and Rosbash, M. (1997). A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic acids research* 25, 1042-1049.
- Berkhout, B. (1996). Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 54, 1-34.
- Berkhout, B., Ooms, M., Beerens, N., Huthoff, H., Southern, E., and Verhoef, K. (2002). In vitro evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 277, 19967-19975.
- Bernacchi, S., Henriët, S., Dumas, P., Paillart, J.C., and Marquet, R. (2007). RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: a fluorescence study. *The Journal of biological chemistry* 282, 26361-26368.
- Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2002). HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the

secondary structure of TAR and its complementary sequence. *Journal of molecular biology* 317, 385-399.

- Berry, N., Ariyoshi, K., Jaffar, S., Sabally, S., Corrah, T., Tedder, R., and Whittle, H. (1998). Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *Journal of human virology* 1, 457-468.
- Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters* 56, 930-933.
- Boily, M.C., Baggaley, R.F., Wang, L., Masse, B., White, R.G., Hayes, R.J., and Alary, M. (2009). Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies. *The Lancet. Infectious diseases* 9, 118-129.
- Bolinger, C., and Boris-Lawrie, K. (2009). Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology* 6, 8.
- Bombarda, E., Grell, E., Roques, B.P., and Mely, Y. (2007). Molecular mechanism of the Zn²⁺-induced folding of the distal CCHC finger motif of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biophysical journal* 93, 208-217.
- Bombarda, E., Morellet, N., Cherradi, H., Spiess, B., Bouaziz, S., Grell, E., Roques, B.P., and Mely, 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⁺. *Journal of molecular biology* 310, 659-672.
- Boudier, C., Humbert, N., Chaminade, F., Chen, Y., de Rocquigny, H., Godet, J., Mauffret, O., Fosse, P., and Mely, Y. (2014). Dynamic interactions of the HIV-1 Tat with nucleic acids are critical for Tat activity in reverse transcription. *Nucleic acids research* 42, 1065-1078.
- Boudier, C., Storchak, R., Sharma, K.K., Didier, P., Follenius-Wund, A., Muller, S., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2010). The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *Journal of molecular biology* 400, 487-501.
- Bourbigot, S., Ramalanjaona, N., Boudier, C., Salgado, G.F., Roques, B.P., Mely, Y., Bouaziz, S., and Morellet, N. (2008). How the HIV-1 nucleocapsid protein binds and destabilises the (-)primer binding site during reverse transcription. *Journal of molecular biology* 383, 1112-1128.
- Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. (1996a). Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *Journal of virology* 70, 3551-3560.
- Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. (1996b). Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. *Journal of virology* 70, 4220-4227.
- Braaten, D., and Luban, J. (2001). Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *The EMBO journal* 20, 1300-1309.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelmann, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-926.

- Bres, V., Tagami, H., Peloponese, J.M., Loret, E., Jeang, K.T., Nakatani, Y., Emiliani, S., Benkirane, M., and Kiernan, R.E. (2002). Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *The EMBO journal* *21*, 6811-6819.
- Breuer, S., Chang, M.W., Yuan, J., and Torbett, B.E. (2012). Identification of HIV-1 inhibitors targeting the nucleocapsid protein. *Journal of medicinal chemistry* *55*, 4968-4977.
- Brierley, I., and Dos Ramos, F.J. (2006). Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus research* *119*, 29-42.
- Briggs, J.A., Grunewald, K., Glass, B., Forster, F., Krausslich, H.G., and Fuller, S.D. (2006). The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* *14*, 15-20.
- Broder, S. (2010). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral research* *85*, 1-18.
- Brown, P.H., Tiley, L.S., and Cullen, B.R. (1991). Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences. *Journal of virology* *65*, 3340-3343.
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 523-527.
- Buckman, J.S., Bosche, W.J., and Gorelick, R.J. (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. *Journal of virology* *77*, 1469-1480.
- Bukrinskaya, A.G. (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology* *149*, 1067-1082.
- Buonaguro, L., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology* *81*, 10209-10219.
- Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P., and 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. *Journal of virology* *73*, 8527-8540.
- Burton, G.F., Keele, B.F., Estes, J.D., Thacker, T.C., and Gartner, S. (2002). Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Seminars in immunology* *14*, 275-284.
- Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., and Hoffmann, C. (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nature reviews. Microbiology* *3*, 848-858.
- Calmy, A., Hirschel, B., Cooper, D.A., and Carr, A. (2009). A new era of antiretroviral drug toxicity. *Antiviral therapy* *14*, 165-179.
- Campbell, R.S., and Robinson, W.F. (1998). The comparative pathology of the lentiviruses. *Journal of comparative pathology* *119*, 333-395.
- Campbell, S., and Rein, A. (1999). In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *Journal of virology* *73*, 2270-2279.

- Carr, A. (2003). Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nature reviews. Drug discovery* 2, 624-634.
- Carteau, S., Batson, S.C., Poljak, L., Mouscadet, J.F., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Roques, B.P., Kas, E., and Auclair, C. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein specifically stimulates Mg²⁺-dependent DNA integration in vitro. *Journal of virology* 71, 6225-6229.
- Carteau, S., Gorelick, R.J., and Bushman, F.D. (1999). Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *Journal of virology* 73, 6670-6679.
- Cavarelli, M., and Scarlatti, G. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission and prevention: successes and controversies. *Journal of internal medicine* 270, 561-579.
- Cen, S., Huang, Y., Khorchid, A., Darlix, J.L., Wainberg, M.A., and Kleiman, L. (1999). The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA^{3Lys} to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *Journal of virology* 73, 4485-4488.
- Chamond, N., Locker, N., and Sargueil, B. (2010). The different pathways of HIV genomic RNA translation. *Biochemical Society transactions* 38, 1548-1552.
- Chan, B., Weidemaier, K., Yip, W.T., Barbara, P.F., and Musier-Forsyth, K. (1999). Intra-tRNA distance measurements for nucleocapsid protein-independent tRNA unwinding during priming of HIV reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 459-464.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *Journal of virology* 66, 2814-2820.
- Charneau, P., and Clavel, F. (1991). A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *Journal of virology* 65, 2415-2421.
- Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. (2008). The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5, 41.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. (2004). Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* 24, 2637-2648.
- Checkley, M.A., Luttge, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of molecular biology* 410, 582-608.
- Chen, H., and Engelman, A. (1998). The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15270-15274.

- Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J.A., Mansky, L.M., and Benichou, S. (2004). Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 279, 28419-28425.
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Jr., Sowder, R.C., 2nd, Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J., *et al.* (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of virology* 80, 9039-9052.
- Chiu, T.K., and Davies, D.R. (2004). Structure and function of HIV-1 integrase. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 965-977.
- Chiu, Y.L., Ho, C.K., Saha, N., Schwer, B., Shuman, S., and Rana, T.M. (2002). Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Molecular cell* 10, 585-597.
- Chukkapalli, V., Hogue, I.B., Boyko, V., Hu, W.S., and Ono, A. (2008). Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate is essential for efficient gag membrane binding. *Journal of virology* 82, 2405-2417.
- Chung, J., Mujeeb, A., Jiang, Y., Guilbert, C., Pendke, M., Wu, Y., and James, T.L. (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* 47, 8148-8156.
- Chung, J., Ulyanov, N.B., Guilbert, C., Mujeeb, A., and James, T.L. (2010). Binding characteristics of small molecules that mimic nucleocapsid protein-induced maturation of stem-loop 1 of HIV-1 RNA. *Biochemistry* 49, 6341-6351.
- Cimarelli, A., and Darlix, J.L. (2002). Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1166-1184.
- Cimarelli, A., Sandin, S., Hoglund, S., and Luban, J. (2000). Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *Journal of virology* 74, 3046-3057.
- Clapham, P.R., and McKnight, A. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. *British medical bulletin* 58, 43-59.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., *et al.* (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Clever, J., Sasseti, C., and Parslow, T.G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 69, 2101-2109.
- Clever, J.L., and Parslow, T.G. (1997). Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *Journal of virology* 71, 3407-3414.
- Cochrane, A.W., McNally, M.T., and Mouland, A.J. (2006). The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology* 3, 18.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).

- Cohen, M.S. (2004). HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* 12, 104-107.
- Corbin A, G.B., Roingard P, Darlix JL, Muriaux D (2008). Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1. *Medecine Sciences* 24, 49-55.
- Coren, L.V., Thomas, J.A., Chertova, E., Sowder, R.C., 2nd, Gagliardi, T.D., Gorelick, R.J., and Ott, D.E. (2007). Mutational analysis of the C-terminal gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 81, 10047-10054.
- Craigie, R., and Bushman, F.D. (2012). HIV DNA integration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006890.
- Cristofari, G., and Darlix, J.L. (2002). The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 72, 223-268.
- Cronin, J., Zhang, X.Y., and Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current gene therapy* 5, 387-398.
- Cruceanu, M., Urbaneja, M.A., Hixson, C.V., Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J., Casas-Finet, J.R., *et al.* (2006). Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic acids research* 34, 593-605.
- D'Arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boue, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., *et al.* (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E1343-1352.
- D'Souza, V., and Summers, M.F. (2004). Structural basis for packaging the dimeric genome of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 431, 586-590.
- Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., and Krausslich, H.G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology* 79, 1581-1594.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.
- Dardel, F., Marquet, R., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Blanquet, S. (1998). Solution studies of the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *Nucleic acids research* 26, 3567-3571.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., and Barre-Sinoussi, F. (1990). Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of molecular biology* 216, 689-699.
- Darlix, J.L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fosse, P., Mauffret, O., and Mely, Y. (2011). Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Journal of molecular biology* 410, 565-581.
- Darlix, J.L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H., and Roques, B.P. (1995). First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *Journal of molecular biology* 254, 523-537.

- Darlix, J.L., Vincent, A., Gabus, C., de Rocquigny, H., and 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 de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 316, 763-771.
- Das, S.R., and Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *The Indian journal of medical research* 121, 315-332.
- Datta, S.A., Temeselew, L.G., Crist, R.M., Soheilian, F., Kamata, A., Mirro, J., Harvin, D., Nagashima, K., Cachau, R.E., and Rein, A. (2011). On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *Journal of virology* 85, 4111-4121.
- Dayton, A.I. (2004). Within you, without you: HIV-1 Rev and RNA export. *Retrovirology* 1, 35.
- De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N., and Summers, M.F. (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279, 384-388.
- de Marco, A., Heuser, A.M., Glass, B., Krausslich, H.G., Muller, B., and Briggs, J.A. (2012). Role of the SP2 domain and its proteolytic cleavage in HIV-1 structural maturation and infectivity. *Journal of virology* 86, 13708-13716.
- De Rijck, J., Bartholomeeusen, K., Ceulemans, H., Debyser, Z., and Gijssbers, R. (2010). High-resolution profiling of the LEDGF/p75 chromatin interaction in the ENCODE region. *Nucleic acids research* 38, 6135-6147.
- de Rocquigny, H., Shvadchak, V., Avilov, S., Dong, C.Z., Dietrich, U., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2008). Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-HIV-1 therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry* 8, 24-35.
- de Rocquigny, H., El Meshri, S.E., Richert, L., Didier, P., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2014). Role of the nucleocapsid region in HIV-1 Gag assembly as investigated by quantitative fluorescence-based microscopy. *Virus research* 193, 78-88.
- De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B., and Darlix, J.L. (1992). Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6472-6476.
- de Rocquigny, H., Shvadchak, V., Avilov, S., Dong, C.Z., Dietrich, U., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2008). Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-HIV-1 therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry* 8, 24-35.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., and Beaumelle, B. (2012). The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13, 355-363.
- Debouck, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W., and Rosenberg, M. (1987). Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8903-8906.
- Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.M., Cogniaux, J., Jacob, G.S., Howard, S.C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A., Jean, F., *et al.* (1994). The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-I TM). *The Journal of biological chemistry* 269, 12240-12247.

- Delaunay, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.C., and Simon, F. (2011). HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet* 378, 1894.
- Demene, H., Dong, C.Z., Ottmann, M., Rouyez, M.C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., Saragosti, S., *et al.* (1994). ¹H NMR structure and biological studies of the His23-->Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. *Biochemistry* 33, 11707-11716.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666.
- DeStefano, J.J., Mallaber, L.M., Rodriguez-Rodriguez, L., Fay, P.J., and Bambara, R.A. (1992). Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Journal of virology* 66, 6370-6378.
- Dib-Hajj, F., Khan, R., and Giedroc, D.P. (1993). Retroviral nucleocapsid proteins possess potent nucleic acid strand renaturation activity. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2, 231-243.
- Dietz, J., Koch, J., Kaur, A., Raja, C., Stein, S., Grez, M., Pustowka, A., Mensch, S., Ferner, J., Moller, L., *et al.* (2008). Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal Psi. *ChemMedChem* 3, 749-755.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., and Skinner, M.A. (1990). HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *The EMBO journal* 9, 4145-4153.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A., and Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6925-6929.
- Dismuke, D.J., and Aiken, C. (2006). Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *Journal of virology* 80, 3712-3720.
- Do, T., Murphy, G., Earl, L.A., Del Prete, G.Q., Grandinetti, G., Li, G.H., Estes, J.D., Rao, P., Trubey, C.M., Thomas, J., *et al.* (2014). Three-dimensional imaging of HIV-1 virological synapses reveals membrane architectures involved in virus transmission. *Journal of virology* 88, 10327-10339.
- Dobard, C.W., Briones, M.S., and Chow, S.A. (2007). Molecular mechanisms by which human immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse transcription. *Journal of virology* 81, 10037-10046.
- Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A., and Gottlinger, H.G. (1993). Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Journal of virology* 67, 6159-6169.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A., and Gottlinger, H.G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Journal of virology* 68, 1689-1696.

- Dove, B.K., Bicknell, K., Brooks, G., Harrison, S., and Hiscox, J.A. (2006a). Infectious bronchitis coronavirus induces cell-cycle perturbations. *Advances in experimental medicine and biology* 581, 357-362.
- Dove, B.K., You, J.H., Reed, M.L., Emmett, S.R., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2006b). Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cellular microbiology* 8, 1147-1157.
- Druillennec, S., Dong, C.Z., Escaich, S., Gresh, N., Bousseau, A., Roques, B.P., and Fournie-Zaluski, M.C. (1999). A mimic of HIV-1 nucleocapsid protein impairs reverse transcription and displays antiviral activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4886-4891.
- Dube, M., Bego, M.G., Paquay, C., and Cohen, E.A. (2010). Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7, 114.
- Dudding, L.R., Nkabinde, N.C., and Mizrahi, V. (1991). Analysis of the RNA- and DNA-dependent DNA polymerase activities of point mutants of HIV-1 reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Biochemistry* 30, 10498-10506.
- Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoude, G., Jadwin, J.A., de La Cruz, J., Nagashima, K., and Bouamr, F. (2009). The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS pathogens* 5, e1000339.
- Egele, C., Schaub, E., Piemont, E., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2005). Investigation by fluorescence correlation spectroscopy of the chaperoning interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with the viral DNA initiation sequences. *Comptes rendus biologiques* 328, 1041-1051.
- Egele, C., Schaub, E., Ramalanjaona, N., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2004). HIV-1 nucleocapsid protein binds to the viral DNA initiation sequences and chaperones their kissing interactions. *Journal of molecular biology* 342, 453-466.
- El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mely, Y., and de Rocquigny, H. (2015). Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *Journal of molecular biology* 427, 1480-1494.
- Engelman, A., Mizuuchi, K., and Craigie, R. (1991). HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67, 1211-1221.
- Ennifar, E., Walter, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Dumas, P. (2001). Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nature structural biology* 8, 1064-1068.
- Ennifar, E., Yusupov, M., Walter, P., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Dumas, P. (1999). The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* 7, 1439-1449.
- Este, J.A., and Cihlar, T. (2010). Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral research* 85, 25-33.
- Evans, L.A., Moreau, J., Odehouri, K., Seto, D., Thomson-Honnebier, G., Legg, H., Barboza, A., Cheng-Mayer, C., and Levy, J.A. (1988). Simultaneous isolation of HIV-1 and HIV-2 from an AIDS patient. *Lancet* 2, 1389-1391.

- Fackler, O.T., Alcover, A., and Schwartz, O. (2007). Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nature reviews. Immunology* 7, 310-317.
- Farjot, G., Sergeant, A., and Mikaelian, I. (1999). A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *The Journal of biological chemistry* 274, 17309-17317.
- Farnet, C.M., and Bushman, F.D. (1997). HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88, 483-492.
- Farnet, C.M., and Haseltine, W.A. (1991). Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *Journal of virology* 65, 1910-1915.
- Fassati, A. (2006). HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem. *Retrovirology* 3, 74.
- Fassati, A. (2012). Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus research* 170, 15-24.
- Fassati, A., and Goff, S.P. (2001). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 75, 3626-3635.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Feng, Y.X., Campbell, S., Harvin, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and 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. *Journal of virology* 73, 4251-4256.
- Fernandes, J., Jayaraman, B., and Frankel, A. (2012). The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA biology* 9, 6-11.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R., and Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *The EMBO journal* 13, 4105-4112.
- Fisher, R.J., Rein, A., Fivash, M., Urbaneja, M.A., Casas-Finet, J.R., Medaglia, M., and Henderson, L.E. (1998). Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *Journal of virology* 72, 1902-1909.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Forshey, B.M., von Schwedler, U., Sundquist, W.I., and Aiken, C. (2002). Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *Journal of virology* 76, 5667-5677.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., and Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359-362.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.
- Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* 67, 1-25.

- Freed, E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* 26, 13-33.
- Freed, E.O., and Martin, M.A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *Journal of virology* 70, 341-351.
- Friedman-Kien, A.E. (1981). Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *Journal of the American Academy of Dermatology* 5, 468-471.
- Friedrich, B.M., Dziuba, N., Li, G., Endsley, M.A., Murray, J.L., and Ferguson, M.R. (2011). Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus research* 161, 101-114.
- Fujiwara, T., Suzuki, S., Kanno, M., Sugiyama, H., Takahashi, H., and Tanaka, J. (2006). Mapping a nucleolar targeting sequence of an RNA binding nucleolar protein, Nop25. *Experimental cell research* 312, 1703-1712.
- Gabus, C., Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W.K., Marc, D., Nandi, P., *et al.* (2001). The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *The Journal of biological chemistry* 276, 19301-19309.
- Galati, D., Paiardini, M., Cervasi, B., Albrecht, H., Bocchino, M., Costantini, A., Montroni, M., Magnani, M., Piedimonte, G., and Silvestri, G. (2003). Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *The Journal of infectious diseases* 188, 1483-1491.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., *et al.* (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., *et al.* (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
- Galvin, S.R., and Cohen, M.S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature reviews. Microbiology* 2, 33-42.
- Garcia, J.A., Ou, S.H., Wu, F., Lusic, A.J., Sparkes, R.S., and Gaynor, R.B. (1992). Cloning and chromosomal mapping of a human immunodeficiency virus 1 "TATA" element modulatory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9372-9376.
- Garg, D., and Torbett, B.E. (2014). Advances in targeting nucleocapsid-nucleic acid interactions in HIV-1 therapy. *Virus research* 193, 135-143.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., *et al.* (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.
- Gatignol, A. (2007). Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Advances in pharmacology* 55, 137-159.

- Gaynor, R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* 6, 347-363.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M.A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156, 171-176.
- Ghanam, R.H., Samal, A.B., Fernandez, T.F., and Saad, J.S. (2012). Role of the HIV-1 Matrix Protein in Gag Intracellular Trafficking and Targeting to the Plasma Membrane for Virus Assembly. *Frontiers in microbiology* 3, 55.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59, 103-112.
- Gilbert, P.B., McKeague, I.W., Eisen, G., Mullins, C., Gueye, N.A., Mboup, S., and Kanki, P.J. (2003). Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Statistics in medicine* 22, 573-593.
- Girard, F., Barbault, F., Gouyette, C., Huynh-Dinh, T., Paoletti, J., and Lancelot, G. (1999). Dimer initiation sequence of HIV-1Lai genomic RNA: NMR solution structure of the extended duplex. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 16, 1145-1157.
- Godet, J., Boudier, C., Humbert, N., Ivanyi-Nagy, R., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2012). Comparative nucleic acid chaperone properties of the nucleocapsid protein NCp7 and Tat protein of HIV-1. *Virus research* 169, 349-360.
- Godet, J., and Mely, Y. (2010). Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA biology* 7, 687-699.
- Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K.K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Duportail, G., and Mely, Y. (2011). Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. *Nucleic acids research* 39, 6633-6645.
- Goebel, F.D., Hemmer, R., Schmit, J.C., Bogner, J.R., de Clercq, E., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Valeyev, R., Vandeveld, M., Margery, H., *et al.* (2001). Phase I/II dose escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamide in patients failing on current antiretroviral therapy. *Aids* 15, 33-45.
- Goldschmidt V, M.J.L., De Rocquigny H, Darlix JL, Mely Y. (2010). The nucleocapsid protein of HIV-1 as a promising therapeutic target for antiviral drugs. *HIV therapy* 4, 179-198.
- Gopalakrishnan, V., Peliska, J.A., and Benkovic, S.J. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10763-10767.

- Gorelick, R.J., Chabot, D.J., Rein, A., Henderson, L.E., and Arthur, L.O. (1993). The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *Journal of virology* 67, 4027-4036.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 305, 1425-1431.
- Gottlinger, H.G. (2001). The HIV-1 assembly machine. *Aids* 15 *Suppl* 5, S13-20.
- Goudreau, N., Hucke, O., Faucher, A.M., Grand-Maitre, C., Lepage, O., Bonneau, P.R., Mason, S.W., and 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. *Journal of molecular biology* 425, 1982-1998.
- Grattinger, M., Hohenberg, H., Thomas, D., Wilk, T., Muller, B., and Krausslich, H.G. (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.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281, 269-272.
- Grigorov, B., Bocquin, A., Gabus, C., Avilov, S., Mely, Y., Agopian, A., Divita, G., Gottikh, M., Witvrouw, M., and Darlix, J.L. (2011). Identification of a methylated oligoribonucleotide as a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcription complex. *Nucleic acids research* 39, 5586-5596.
- Grove, J. (2014). Super-resolution microscopy: a virus' eye view of the cell. *Viruses* 6, 1365-1378.
- Guenzel, C.A., Herate, C., and Benichou, S. (2014). HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Frontiers in microbiology* 5, 127.
- Guo, J., Henderson, L.E., Bess, J., Kane, B., and Levin, J.G. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA. *Journal of virology* 71, 5178-5188.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662-669.
- Haddrick, M., Lear, A.L., Cann, A.J., and Heaphy, S. (1996). Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *Journal of molecular biology* 259, 58-68.
- Hagan, N., and Fabris, D. (2003). Direct mass spectrometric determination of the stoichiometry and binding affinity of the complexes between nucleocapsid protein and RNA stem-loop hairpins of the HIV-1 Psi-recognition element. *Biochemistry* 42, 10736-10745.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614.
- Hargittai, M.R., Mangla, A.T., Gorelick, R.J., and 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. *Journal of molecular biology* 312, 985-997.

- Harrich, D., Ulich, C., and Gaynor, R.B. (1996). A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Journal of virology* 70, 4017-4027.
- Harrison, G.P., and Lever, A.M. (1992). The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *Journal of virology* 66, 4144-4153.
- Henderson, B.R., and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *Journal of molecular biology* 274, 693-707.
- Henderson, L.E., Bowers, M.A., Sowder, R.C., 2nd, Serabyn, S.A., Johnson, D.G., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Bryant, D.K., and Fenselau, C. (1992). Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *Journal of virology* 66, 1856-1865.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 6, 225-242.
- Henriet, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.C., and Marquet, R. (2005). Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *Journal of molecular biology* 354, 55-72.
- Henriet, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R.J., Marquet, R., and 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 research* 35, 5141-5153.
- Hill, M., Tachedjian, G., and Mak, J. (2005). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Current HIV research* 3, 73-85.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.
- Hope, T.J. (1999). The ins and outs of HIV Rev. *Archives of biochemistry and biophysics* 365, 186-191.
- Huang, M., Maynard, A., Turpin, J.A., Graham, L., Janini, G.M., Covell, D.G., and Rice, W.G. (1998). Anti-HIV agents that selectively target retroviral nucleocapsid protein zinc fingers without affecting cellular zinc finger proteins. *Journal of medicinal chemistry* 41, 1371-1381.
- Huang, S.T., Lee, H.C., Liu, K.H., Lee, N.Y., and Ko, W.C. (2005). Acute human immunodeficiency virus infection. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 38, 65-68.
- Hulme, A.E., Perez, O., and Hope, T.J. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9975-9980.
- Huthoff, H., and Berkhout, B. (2001). Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *Rna* 7, 143-157.
- Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F., and Bukrinsky, M. (2006). Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology* 3, 4.

- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *Journal of molecular biology* 290, 929-941.
- Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Krausslich, H.G., Eils, R., Rohr, K., Brauchle, C., Muller, B., and Lamb, D.C. (2009). Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS pathogens* 5, e1000652.
- Ivanyi-Nagy, R., Davidovic, L., Khandjian, E.W., and Darlix, J.L. (2005). Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1409-1417.
- Jablonski, J.A., Amelio, A.L., Giacca, M., and Caputi, M. (2010). The transcriptional transactivator Tat selectively regulates viral splicing. *Nucleic acids research* 38, 1249-1260.
- Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R., and Varmus, H.E. (1988). Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* 55, 447-458.
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., *et al.* (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 481, 365-370.
- Jayappa, K.D., Ao, Z., Wang, X., Mouland, A.J., Shekhar, S., Yang, X., and Yao, X. (2015). Human immunodeficiency virus type 1 employs the cellular dynein light chain 1 protein for reverse transcription through interaction with its integrase protein. *Journal of virology* 89, 3497-3511.
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K., and Greene, W.C. (1998). Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *The Journal of cell biology* 143, 875-885.
- Jewell, N.A., and Mansky, L.M. (2000). In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *The Journal of general virology* 81, 1889-1899.
- Ji, X., Klarmann, G.J., and Preston, B.D. (1996). Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity in vitro. *Biochemistry* 35, 132-143.
- Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q.J. (2007). Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 81, 5547-5560.
- Jolly, C., and Sattentau, Q.J. (2004). Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* 5, 643-650.
- Jouvenet, N., Simon, S.M., and Bieniasz, P.D. (2009). Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19114-19119.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., and Simon, S.M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nature cell biology* 13, 394-401.
- Jowett, J.B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.L., and Chen, I.S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of virology* 69, 6304-6313.

- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., and Meyerhans, A. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418, 144.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E., and Ott, M. (2003). Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Molecular cell* 12, 167-176.
- Kahn, J.O., and Walker, B.D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 339, 33-39.
- Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R., and Goff, S.P. (1994). Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266, 2002-2006.
- Kanki, P.J., Travers, K.U., S, M.B., Hsieh, C.C., Marlink, R.G., Gueye, N.A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., Sankale, J.L., *et al.* (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343, 943-946.
- Kaplan, A.H., Manchester, M., and 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. *Journal of virology* 68, 6782-6786.
- Karageorgos, L., Li, P., and Burrell, C. (1993). Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS research and human retroviruses* 9, 817-823.
- Karn, J. (1999). Tackling Tat. *Journal of molecular biology* 293, 235-254.
- Karn, J., and Stoltzfus, C.M. (2012). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006916.
- Kempf, N., Postupalenko, V., Bora, S., Didier, P., Arntz, Y., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2015). The HIV-1 nucleocapsid protein recruits negatively charged lipids to ensure its optimal binding to lipid membranes. *Journal of virology* 89, 1756-1767.
- Kestler, H.W., 3rd, Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., and Desrosiers, R.C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651-662.
- Kim, J.K., Palaniappan, C., Wu, W., Fay, P.J., and Bambara, R.A. (1997). Evidence for a unique mechanism of strand transfer from the transactivation response region of HIV-1. *The Journal of biological chemistry* 272, 16769-16777.
- Klarmann, G.J., Schaubert, C.A., and Preston, B.D. (1993). Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268, 9793-9802.
- Kleiman, L. (2002). tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB life* 53, 107-114.
- Kleiman, L., Halwani, R., and Javanbakht, H. (2004). The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Current HIV research* 2, 163-175.
- Klein, K.C., Reed, J.C., and Lingappa, J.R. (2007). Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag. *AIDS reviews* 9, 150-161.

- Kleinman, C.L., Doria, M., Orecchini, E., Giuliani, E., Galardi, S., De Jay, N., and Michienzi, A. (2014). HIV-1 infection causes a down-regulation of genes involved in ribosome biogenesis. *PLoS one* 9, e113908.
- Klotman, M.E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D., and Wong-Staal, F. (1991). Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5011-5015.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4686-4690.
- Kondo, M., Shima, T., Nishizawa, M., Sudo, K., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., and 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. *The Journal of infectious diseases* 192, 56-61.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., *et al.* (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Konnyu, B., Sadiq, S.K., Turanyi, T., Hirmondo, R., Muller, B., Krausslich, H.G., Coveney, P.V., and Muller, V. (2013). Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. *PLoS computational biology* 9, e1003103.
- Korber, B.T., Allen, E.E., Farmer, A.D., and Myers, G.L. (1995). Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *Aids* 9 *Suppl A*, S5-18.
- Krishnamoorthy, G., Roques, B., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2003). DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic acids research* 31, 5425-5432.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Irelan, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., *et al.* (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60.
- Kukolj, G., and Skalka, A.M. (1995). Enhanced and coordinated processing of synapsed viral DNA ends by retroviral integrases in vitro. *Genes & development* 9, 2556-2567.
- Kurzawa, L., Pellerano, M., and Morris, M.C. (2010). PEP and CADY-mediated delivery of fluorescent peptides and proteins into living cells. *Biochimica et biophysica acta* 1798, 2274-2285.
- Kutluay, S.B., and Bieniasz, P.D. (2010). Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS pathogens* 6, e1001200.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- Lonnais, S., Gorelick, R.J., Heniche-Boukhalfa, F., Bouaziz, S., Parissi, V., Mouscadet, J.F., Restle, T., Gatell, J.M., Le Cam, E., and 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 research* 171, 287-303.

- Lam, W.C., Maki, A.H., Casas-Finet, J.R., Erickson, J.W., Kane, B.P., Sowder, R.C., 2nd, and Henderson, L.E. (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* 33, 10693-10700.
- Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H., Van Gent, D., Roques, B., Plasterk, R., and Darlix, J.L. (1993). Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic acids research* 21, 831-839.
- Lapadat-Tapolsky, M., Pernelle, C., Borie, C., and Darlix, J.L. (1995). Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1. *Nucleic acids research* 23, 2434-2441.
- Larson, D.R., Ma, Y.M., Vogt, V.M., and Webb, W.W. (2003). Direct measurement of Gag-Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of cell biology* 162, 1233-1244.
- Laughrea, M., and Jette, L. (1994). A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* 33, 13464-13474.
- Laughrea, M., and Jette, L. (1996). HIV-1 genome dimerization: formation kinetics and thermal stability of dimeric HIV-1Lai RNAs are not improved by the 1-232 and 296-790 regions flanking the kissing-loop domain. *Biochemistry* 35, 9366-9374.
- Laughrea, M., Jette, L., Mak, J., Kleiman, L., Liang, C., and Wainberg, M.A. (1997). Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *Journal of virology* 71, 3397-3406.
- Le Grice, S.F., Naas, T., Wohlgensinger, B., and Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *The EMBO journal* 10, 3905-3911.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., and Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *The Journal of biological chemistry* 277, 45091-45098.
- Leblanc, P., Baas, D., and Darlix, J.L. (2004). Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line. *Journal of molecular biology* 337, 1035-1051.
- Lee, K., Ambrose, Z., Martin, T.D., Oztop, I., Mulky, A., Julias, J.G., Vandegraaff, N., Baumann, J.G., Wang, R., Yuen, W., *et al.* (2010). Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell host & microbe* 7, 221-233.
- Lelek, M., Di Nunzio, F., Henriques, R., Charneau, P., Arhel, N., and Zimmer, C. (2012). Superresolution imaging of HIV in infected cells with FIAsh-PALM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 8564-8569.
- Leonard, J., Parrott, C., Buckler-White, A.J., Turner, W., Ross, E.K., Martin, M.A., and Rabson, A.B. (1989). The NF-kappa B binding sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are not required for virus infectivity. *Journal of virology* 63, 4919-4924.
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *Journal of virology* 63, 4085-4087.

- Lever, A.M., and Berkhout, B. (2008). 2008 Nobel prize in medicine for discoverers of HIV. *Retrovirology* 5, 91.
- Levin, J.G., Mitra, M., Mascarenhas, A., and Musier-Forsyth, K. (2010). Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA biology* 7, 754-774.
- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., and Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840-842.
- Lewinski, M.K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannehalli, S., *et al.* (2006). Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS pathogens* 2, e60.
- Li, J., Potash, M.J., and Volsky, D.J. (2004). Functional domains of APOBEC3G required for antiviral activity. *Journal of cellular biochemistry* 92, 560-572.
- Li, L., Olvera, J.M., Yoder, K.E., Mitchell, R.S., Butler, S.L., Lieber, M., Martin, S.L., and Bushman, F.D. (2001). Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *The EMBO journal* 20, 3272-3281.
- Lin, M.H., Apolloni, A., Cutillas, V., Sivakumaran, H., Martin, S., Li, D., Wei, T., Wang, R., Jin, H., Spann, K., *et al.* (2015). A mutant tat protein inhibits HIV-1 reverse transcription by targeting the reverse transcription complex. *Journal of virology* 89, 4827-4836.
- Linde, M.E., Colquhoun, D.R., Ubaida Mohien, C., Kole, T., Aquino, V., Cotter, R., Edwards, N., Hildreth, J.E., and Graham, D.R. (2013). The conserved set of host proteins incorporated into HIV-1 virions suggests a common egress pathway in multiple cell types. *Journal of proteome research* 12, 2045-2054.
- Lindwasser, O.W., Chaudhuri, R., and Bonifacino, J.S. (2007). Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Current molecular medicine* 7, 171-184.
- Lingappa, J.R., Dooher, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K., and Klein, K.C. (2006). Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *The Journal of biological chemistry* 281, 3773-3784.
- Lingappa, J.R., Reed, J.C., Tanaka, M., Chutiraka, K., and Robinson, B.A. (2014). How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. *Virus research* 193, 89-107.
- Liu, B., Dai, R., Tian, C.J., Dawson, L., Gorelick, R., and Yu, X.F. (1999). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *Journal of virology* 73, 2901-2908.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M., and Poeschla, E.M. (2004). LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *Journal of virology* 78, 9524-9537.
- Lochrie, M.A., Waugh, S., Pratt, D.G., Jr., Clever, J., Parslow, T.G., and Polisky, B. (1997). In vitro selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic acids research* 25, 2902-2910.

- Louise C. Parr-Brownlie, 2 Clémentine Bosch-Bouju,3,† Lucia Schoderboeck,2,4,5,† Rachel J. Sizemore,1,2 Wickliffe C. Abraham,2,5 and Stephanie M. Hughes2 (2015). Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *frontiers in molecular neuroscience* 8.
- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V., and Goff, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73, 1067-1078.
- Lyonnais, S., Gorelick, R.J., Heniche-Boukhalfa, F., Bouaziz, S., Parissi, V., Mouscadet, J.F., Restle, T., Gatell, J.M., Le Cam, E., and 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 research* 171, 287-303.
- Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348.
- Mak, J., and Kleiman, L. (1997). Primer tRNAs for reverse transcription. *Journal of virology* 71, 8087-8095.
- Maki, A.H., Ozarowski, A., Misra, A., Urbaneja, M.A., and Casas-Finet, J.R. (2001). Phosphorescence and optically detected magnetic resonance of HIV-1 nucleocapsid protein complexes with stem-loop sequences of the genomic Psi-recognition element. *Biochemistry* 40, 1403-1412.
- Maldarelli, F., Chen, M.Y., Willey, R.L., and Strebel, K. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *Journal of virology* 67, 5056-5061.
- Malim, M.H., and Emerman, M. (2008). HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell host & microbe* 3, 388-398.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.
- Malkusch, S., Muranyi, W., Muller, B., Krausslich, H.G., and Heilemann, M. (2013). Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution. *Histochemistry and cell biology* 139, 173-179.
- Mann, D.A., Mikaelian, I., Zimmel, R.W., Green, S.M., Lowe, A.D., Kimura, T., Singh, M., Butler, P.J., Gait, M.J., and Karn, J. (1994). A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *Journal of molecular biology* 241, 193-207.
- Mansky, L.M. (1996). The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* 222, 391-400.
- Marcello, A. (2006). Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology* 3, 7.
- Marshall, H.M., Ronen, K., Berry, C., Llano, M., Sutherland, H., Saenz, D., Bickmore, W., Poeschla, E., and Bushman, F.D. (2007). Role of PSIP1/LEDGF/p75 in lentiviral infectivity and integration targeting. *PLoS one* 2, e1340.

- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N.R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* *114*, 21-31.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., Gueye, E.H., *et al.* (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* *265*, 1587-1590.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nature medicine* *7*, 1313-1319.
- Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nature biotechnology* *23*, 1308-1314.
- Martinez, N.W., Xue, X., Berro, R.G., Kreitzer, G., and Resh, M.D. (2008). Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *Journal of virology* *82*, 9937-9950.
- Massimo, C. (2011). RNA processing.
- Matreyek, K.A., and Engelman, A. (2013). Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses* *5*, 2483-2511.
- Mauclere, P., Loussert-Ajaka, I., Damond, F., Fagot, P., Souquieres, S., Monny Lobe, M., Mbopi Keou, F.X., Barre-Sinoussi, F., Saragosti, S., Brun-Vezinet, F., *et al.* (1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids* *11*, 445-453.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *The Journal of cell biology* *159*, 441-452.
- Mely, Y., De Rocquigny, H., Morellet, N., Roques, B.P., and Gerad, D. (1996). Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* *35*, 5175-5182.
- Mely, Y., de Rocquigny, H., Sorinas-Jimeno, M., Keith, G., Roques, B.P., Marquet, R., and Gerard, D. (1995). Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific. *The Journal of biological chemistry* *270*, 1650-1656.
- Mely, Y., Piemont, E., Sorinas-Jimeno, M., de Rocquigny, H., Jullian, N., Morellet, N., Roques, B.P., and Gerard, 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. *Biophysical journal* *65*, 1513-1522.
- Meng, B., and Lever, A.M. (2013). Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. *Retrovirology* *10*, 5.
- Mergener, K., Facke, M., Welker, R., Brinkmann, V., Gelderblom, H.R., and Krausslich, H.G. (1992). Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology* *186*, 25-39.

- Messer, L.I., Currey, K.M., O'Neill, B.J., Maizel, J.V., Jr., Levin, J.G., and Gerwin, B.I. (1985). Functional analysis of reverse transcription by a frameshift pol mutant of murine leukemia virus. *Virology* 146, 146-152.
- Meyer, B.E., and Malim, M.H. (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & development* 8, 1538-1547.
- Michienzi, A., Cagnon, L., Bahner, I., and Rossi, J.J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8955-8960.
- Michienzi, A., De Angelis, F.G., Bozzoni, I., and Rossi, J.J. (2006). A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS research and therapy* 3, 13.
- Michienzi, A., Li, S., Zaia, J.A., and Rossi, J.J. (2002). A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14047-14052.
- Miller Jenkins, L.M., Ott, D.E., Hayashi, R., Coren, L.V., Wang, D., Xu, Q., Schito, M.L., Inman, J.K., Appella, D.H., and Appella, E. (2010). Small-molecule inactivation of HIV-1 NCp7 by repetitive intracellular acyl transfer. *Nature chemical biology* 6, 887-889.
- Miller, M.D., Farnet, C.M., and Bushman, F.D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of virology* 71, 5382-5390.
- Mirambeau, G., Lyonnais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J., Borde, I., Reboud-Ravaux, M., Restle, T., Gorelick, R.J., *et al.* (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. *PLoS one* 2, e669.
- Mirambeau, G., Lyonnais, S., and Gorelick, R.J. (2010). Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA biology* 7, 724-734.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* 72, 8150-8157.
- Mlcochova, P., Pelchen-Matthews, A., and Marsh, M. (2013). Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC biology* 11, 89.
- Mondor, I., Ugolini, S., and Sattentau, Q.J. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of virology* 72, 3623-3634.
- Morcock, D.R., Thomas, J.A., Gagliardi, T.D., Gorelick, R.J., Roser, J.D., Chertova, E.N., Bess, J.W., Jr., Ott, D.E., Sattentau, Q.J., Frank, I., *et al.* (2005). Elimination of retroviral infectivity by N-ethylmaleimide with preservation of functional envelope glycoproteins. *Journal of virology* 79, 1533-1542.
- Morellet, N., de Rocquigny, H., Mely, Y., Jullian, N., Demene, H., Ottmann, M., Gerard, D., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., and Roques, B.P. (1994). Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by ¹H NMR. *Journal of molecular biology* 235, 287-301.

- Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L., and Roques, B.P. (1992). Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *The EMBO journal* *11*, 3059-3065.
- Mori, M., Kovalenko, L., Lyonnais, S., Antaki, D., Torbett, B.E., Botta, M., Mirambeau, G., and Mely, Y. (2015). Nucleocapsid Protein: A Desirable Target for Future Therapies Against HIV-1. *Current topics in microbiology and immunology* *389*, 53-92.
- Mori, M., Manetti, F., and Botta, M. (2011). Predicting the binding mode of known NCp7 inhibitors to facilitate the design of novel modulators. *Journal of chemical information and modeling* *51*, 446-454.
- Mori, M., Schult-Dietrich, P., Szafarowicz, B., Humbert, N., Debaene, F., Sanglier-Cianferani, S., Dietrich, U., Mely, Y., and Botta, M. (2012). Use of virtual screening for discovering antiretroviral compounds interacting with the HIV-1 nucleocapsid protein. *Virus research* *169*, 377-387.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell host & microbe* *9*, 235-242.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature biotechnology* *19*, 1173-1176.
- Moss, T., and Stefanovsky, V.Y. (1995). Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* *50*, 25-66.
- Mothes, W., Sherer, N.M., Jin, J., and Zhong, P. (2010). Virus cell-to-cell transmission. *Journal of virology* *84*, 8360-8368.
- Moulard, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., and Cohen, E.A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *Journal of virology* *74*, 5441-5451.
- Moulard, M., and Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et biophysica acta* *1469*, 121-132.
- Mourez, T., Simon, F., and Plantier, J.C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical microbiology reviews* *26*, 448-461.
- Munoz-Morris, M.A., Heitz, F., Divita, G., and Morris, M.C. (2007). The peptide carrier Pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochemical and biophysical research communications* *355*, 877-882.
- Muranyi, W., Malkusch, S., Muller, B., Heilemann, M., and Krausslich, 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 pathogens* *9*, e1003198.
- Muriaux, D., and Darlix, J.L. (2010). Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA biology* *7*, 744-753.
- Muriaux, D., De Rocquigny, H., Roques, B.P., and Paoletti, J. (1996). NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *The Journal of biological chemistry* *271*, 33686-33692.

- Muriaux, D., Girard, P.M., Bonnet-Mathoniere, B., and Paoletti, J. (1995). Dimerization of HIV-1Lai RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *The Journal of biological chemistry* 270, 8209-8216.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L., and Springer, J.P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337, 615-620.
- Nazar, R.N. (2004). Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB life* 56, 457-465.
- Neil, S.J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.
- Nekhai, S., and Jeang, K.T. (2006). Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future microbiology* 1, 417-426.
- Nermut, M.V., and Fassati, A. (2003). Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *Journal of virology* 77, 8196-8206.
- Nermut, M.V., Zhang, W.H., Francis, G., Ciampor, F., Morikawa, Y., and Jones, I.M. (2003). Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* 305, 219-227.
- Niederman, T.M., Hastings, W.R., and Ratner, L. (1993). Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology* 197, 420-425.
- Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, M., Kannagi, M., and Masuda, T. (2009). Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection. *PloS one* 4, e7825.
- Nisole, S., and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
- O'Carroll, I.P., Crist, R.M., Mirro, J., Harvin, D., Soheilian, F., Kamata, A., Nagashima, K., and Rein, A. (2012). Functional redundancy in HIV-1 viral particle assembly. *Journal of virology* 86, 12991-12996.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449, 735-739.
- Oeffinger, M., Zenklusen, D., Ferguson, A., Wei, K.E., El Hage, A., Tollervey, D., Chait, B.T., Singer, R.H., and Rout, M.P. (2009). Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Molecular cell* 36, 768-781.
- Ono, A., Ablan, S.D., Lockett, S.J., Nagashima, K., and Freed, E.O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14889-14894.
- Orenstein, J.M., Meltzer, M.S., Phipps, T., and Gendelman, H.E. (1988). Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-

stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *Journal of virology* 62, 2578-2586.

- Ott, D.E. (2008). Cellular proteins detected in HIV-1. *Reviews in medical virology* 18, 159-175.
- Ott, D.E., Coren, L.V., and Gagliardi, T.D. (2005). Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. *Journal of virology* 79, 13839-13847.
- Ott, D.E., Coren, L.V., and Shatzer, T. (2009). The nucleocapsid region of human immunodeficiency virus type 1 Gag assists in the coordination of assembly and Gag processing: role for RNA-Gag binding in the early stages of assembly. *Journal of virology* 83, 7718-7727.
- Paillart, J.C., Berthou, L., Ottmann, M., Darlix, J.L., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1996). A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *Journal of virology* 70, 8348-8354.
- Paillart, J.C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1994). Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *The Journal of biological chemistry* 269, 27486-27493.
- Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., and Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature reviews. Microbiology* 2, 461-472.
- Pannecouque, C., Szafarowicz, B., Volkova, N., Bakulev, V., Dehaen, W., Mely, Y., and Daelemans, D. (2010). Inhibition of HIV-1 replication by a bis-thiadiazolbenzene-1,2-diamine that chelates zinc ions from retroviral nucleocapsid zinc fingers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 1461-1468.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A.S. (1993). New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine* 328, 327-335.
- Paoletti, A.C., Shubsda, M.F., Hudson, B.S., and Borer, P.N. (2002). Affinities of the nucleocapsid protein for variants of SL3 RNA in HIV-1. *Biochemistry* 41, 15423-15428.
- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., Ouedrago, R., Gandji, R., Mpele, P., Dibanga, G., *et al.* (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* 11, 493-498.
- Peliska, J.A., Balasubramanian, S., Giedroc, D.P., and Benkovic, S.J. (1994). Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein accelerates HIV-1 reverse transcriptase catalyzed DNA strand transfer reactions and modulates RNase H activity. *Biochemistry* 33, 13817-13823.
- Pellegrini, O., Mathy, N., Condon, C., and Benard, L. (2008). In vitro assays of 5' to 3'-exoribonuclease activity. *Methods in enzymology* 448, 167-183.
- Pereira, C.F., Ellenberg, P.C., Jones, K.L., Fernandez, T.L., Smyth, R.P., Hawkes, D.J., Hijnen, M., Vivet-Boudou, V., Marquet, R., Johnson, I., *et al.* (2011). Labeling of multiple HIV-1 proteins with the biarsenical-tetracysteine system. *PloS one* 6, e17016.
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J., and Deacon, N.J. (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic acids research* 28, 663-668.

- Permanyer, M., Ballana, E., and Este, J.A. (2010). Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends in microbiology* 18, 543-551.
- Perugi, F., Muriaux, D., Ramirez, B.C., Chabani, S., Decroly, E., Darlix, J.L., Blot, V., and Pique, C. (2009). Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Molecular biology of the cell* 20, 498-508.
- Pettit, S.C., Clemente, J.C., Jeung, J.A., Dunn, B.M., and Kaplan, A.H. (2005). Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. *Journal of virology* 79, 10601-10607.
- Piguet, V., Chen, Y.L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpentier, J.L., and Trono, D. (1998). Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *The EMBO journal* 17, 2472-2481.
- Piller, S.C., Caly, L., and Jans, D.A. (2003). Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Current drug targets* 4, 409-429.
- Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemeé, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 15, 871-872.
- Pluta, K., and Kacprzak, M.M. (2009). Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta biochimica Polonica* 56, 531-595.
- Poljak, L., Batson, S.M., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L., and Kas, E. (2003). Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *Journal of molecular biology* 329, 411-421.
- Popov, S., Popova, E., Inoue, M., and Gottlinger, H.G. (2009). Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *Journal of virology* 83, 7185-7193.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.
- Prabakaran, P., Dimitrov, A.S., Fouts, T.R., and Dimitrov, D.S. (2007). Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Advances in pharmacology* 55, 33-97.
- Prats, A.C., Sarih, L., Gabus, C., Litvak, S., Keith, G., and Darlix, J.L. (1988). Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. *The EMBO journal* 7, 1777-1783.
- Prescher, J., Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Torrano, A.A., Brauchle, C., Muller, B., and Lamb, D.C. (2015). Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites. *PLoS pathogens* 11, e1004677.
- Purcell, D.F., and Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of virology* 67, 6365-6378.
- Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Konigs, C., Schwalbe, H., and Dietrich, U. (2003). Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the

HIV-1 packaging signal psi by screening phage-displayed peptide libraries. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 4, 1093-1097.

- Ramalanjaona, N., de Rocquigny, H., Millet, A., Ficheux, D., Darlix, J.L., and Mely, Y. (2007). Investigating the mechanism of the nucleocapsid protein chaperoning of the second strand transfer during HIV-1 DNA synthesis. *Journal of molecular biology* 374, 1041-1053.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3, 718-729.
- Rawat, A., Vaidya, B., Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mahor, S., Paliwal, R., Rai, S., and Vyas, S.P. (2007). Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview. *Die Pharmazie* 62, 643-658.
- Reed, J.C., Molter, B., Geary, C.D., McNevin, J., McElrath, J., Giri, S., Klein, K.C., and Lingappa, J.R. (2012). HIV-1 Gag co-opts a cellular complex containing DDX6, a helicase that facilitates capsid assembly. *The Journal of cell biology* 198, 439-456.
- Reeves, J.D., and Doms, R.W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology* 83, 1253-1265.
- Reicin, A.S., Kalpana, G., Paik, S., Marmon, S., and Goff, S. (1995). Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *Journal of virology* 69, 5904-5907.
- Rein, A. (2010). Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA biology* 7, 700-705.
- Rein, A., Henderson, L.E., and Levin, J.G. (1998). Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends in biochemical sciences* 23, 297-301.
- Resh, M.D. (2004). A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 417-418.
- Rice, P., Craigie, R., and Davies, D.R. (1996). Retroviral integrases and their cousins. *Current opinion in structural biology* 6, 76-83.
- Rice, W.G., Schaeffer, C.A., Graham, L., Bu, M., McDougal, J.S., Orloff, S.L., Villinger, F., Young, M., Oroszlan, S., Fesen, M.R., et al. (1993). The site of antiviral action of 3-nitrosobenzamide on the infectivity process of human immunodeficiency virus in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9721-9724.
- Rice, W.G., Supko, J.G., Malspeis, L., Buckheit, R.W., Jr., Clanton, D., Bu, M., Graham, L., Schaeffer, C.A., Turpin, J.A., Domagala, J., et al. (1995). Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science* 270, 1194-1197.
- Rice, W.G., Turpin, J.A., Huang, M., Clanton, D., Buckheit, R.W., Jr., Covell, D.G., Wallqvist, A., McDonnell, N.B., DeGuzman, R.N., Summers, M.F., et al. (1997). Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nature medicine* 3, 341-345.
- Rist, M.J., and Marino, J.P. (2002). Mechanism of nucleocapsid protein catalyzed structural isomerization of the dimerization initiation site of HIV-1. *Biochemistry* 41, 14762-14770.

- Riviere, L., Darlix, J.L., and Cimarelli, A. (2010). Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *Journal of virology* *84*, 729-739.
- Roda, R.H., Balakrishnan, M., Hanson, M.N., Wohrl, B.M., Le Grice, S.F., Roques, B.P., Gorelick, R.J., and Bambara, R.A. (2003). Role of the Reverse Transcriptase, Nucleocapsid Protein, and Template Structure in the Two-step Transfer Mechanism in Retroviral Recombination. *The Journal of biological chemistry* *278*, 31536-31546.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of general virology* *91*, 1-12.
- Roques, B.P., Morellet, N., de Rocquigny, H., Demene, H., Schueler, W., and Jullian, N. (1997). Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* *79*, 673-680.
- Roques, P., Robertson, D.L., Souquiere, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barre-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M., and Simon, F. (2004). Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *Aids* *18*, 1371-1381.
- Ross, E.K., Buckler-White, A.J., Rabson, A.B., Englund, G., and Martin, M.A. (1991). Contribution of NF-kappa B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *Journal of virology* *65*, 4350-4358.
- Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., and Benfield, D.A. (1999). The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus research* *64*, 1-12.
- Russell, R.S., Liang, C., and Wainberg, M.A. (2004). Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* *1*, 23.
- Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., and Summers, M.F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11364-11369.
- Sahasranaman, A., Dembowski, J., Strahler, J., Andrews, P., Maddock, J., and Woolford, J.L., Jr. (2011). Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *The EMBO journal* *30*, 4020-4032.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* *110*, 521-529.
- Schroeder, R., Barta, A., and Semrad, K. (2004). Strategies for RNA folding and assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* *5*, 908-919.
- Schur, F.K., Hagen, W.J., Rumlova, M., Ruml, T., Muller, B., Krausslich, H.G., and Briggs, J.A. (2015). Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution. *Nature* *517*, 505-508.
- Schwartz, M.D., Fiore, D., and Panganiban, A.T. (1997). Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. *Journal of virology* *71*, 9295-9305.

- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine* 2, 338-342.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 64, 2519-2529.
- Schwartz, S., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (1992). Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Molecular and cellular biology* 12, 207-219.
- Sette, P., Dussupt, V., and Bouamr, F. (2012). Identification of the HIV-1 NC binding interface in Alix Bro1 reveals a role for RNA. *Journal of virology* 86, 11608-11615.
- Sharma, P.L., Nurpeisov, V., Hernandez-Santiago, B., Beltran, T., and Schinazi, R.F. (2004). Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 895-919.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1, a006841.
- Shvadchak, V., Sanglier, S., Rocle, S., Villa, P., Haiech, J., Hibert, M., Van Dorsselaer, A., Mely, Y., and 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.
- Shehu-Xhilaga, M., Kraeusslich, H.G., Pettit, S., Swanstrom, R., Lee, J.Y., Marshall, J.A., Crowe, S.M., and Mak, J. (2001). Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *Journal of virology* 75, 9156-9164.
- Sheng, N., Pettit, S.C., Tritch, R.J., Ozturk, D.H., Rayner, M.M., Swanstrom, R., and Erickson-Viitanen, S. (1997). Determinants of the human immunodeficiency virus type 1 p15NC-RNA interaction that affect enhanced cleavage by the viral protease. *Journal of virology* 71, 5723-5732.
- Sherman, M.P., and Greene, W.C. (2002). Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 67-73.
- Shubsda, M.F., Paoletti, A.C., Hudson, B.S., and Borer, P.N. (2002). Affinities of packaging domain loops in HIV-1 RNA for the nucleocapsid protein. *Biochemistry* 41, 5276-5282.
- Shvadchak, V., Sanglier, S., Rocle, S., Villa, P., Haiech, J., Hibert, M., Van Dorsselaer, A., Mely, Y., and 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.
- Siekevitz, M., Josephs, S.F., Dukovich, M., Peffer, N., Wong-Staal, F., and Greene, W.C. (1987). Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science* 238, 1575-1578.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* 4, 1032-1037.

- Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1994). Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4945-4949.
- Sleasman, J.W., and Goodenow, M.M. (2003). 13. HIV-1 infection. *The Journal of allergy and clinical immunology* *111*, S582-592.
- Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G.J., and Watkins, N.J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology* *200*, 577-588.
- Stebbing, J., Gazzard, B., and Douek, D.C. (2004). Where does HIV live? *The New England journal of medicine* *350*, 1872-1880.
- Stephen, A.G., Worthy, K.M., Towler, E., Mikovits, J.A., Sei, S., Roberts, P., Yang, Q.E., Akee, R.K., Klausmeyer, P., McCloud, T.G., et al. (2002). Identification of HIV-1 nucleocapsid protein: nucleic acid antagonists with cellular anti-HIV activity. *Biochemical and biophysical research communications* *296*, 1228-1237.
- Stivahtis, G.L., Soares, M.A., Vodicka, M.A., Hahn, B.H., and Emerman, M. (1997). Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *Journal of virology* *71*, 4331-4338.
- Stoltzfus, C.M., and Madsen, J.M. (2006). Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Current HIV research* *4*, 43-55.
- Stoylov, S.P., Vuilleumier, C., Stoylova, E., De Rocquigny, H., Roques, B.P., Gerard, D., and Mely, Y. (1997). Ordered aggregation of ribonucleic acids by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Biopolymers* *41*, 301-312.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Gottlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* *114*, 689-699.
- Strebel, K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* *17 Suppl 4*, S25-34.
- Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., Jr., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., 3rd, Hare, D.R., et al. (1992). Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein science : a publication of the Protein Society* *1*, 563-574.
- Sundquist, W.I., and Krausslich, H.G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* *2*, a006924.
- Suspene, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guetard, D., Pochet, S., Chester, A., Navaratnam, N., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.P. (2004). APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic acids research* *32*, 2421-2429.
- Suzuki, S., Fujiwara, T., and Kanno, M. (2007). Nucleolar protein Nop25 is involved in nucleolar architecture. *Biochemical and biophysical research communications* *358*, 1114-1119.
- Suzuki, S., Kanno, M., Fujiwara, T., Sugiyama, H., Yokoyama, A., Takahashi, H., and Tanaka, J. (2006). Molecular cloning and characterization of Nop25, a novel nucleolar RNA binding protein, highly conserved in vertebrate species. *Experimental cell research* *312*, 1031-1041.

- Suzuki, Y., and Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nature reviews. Microbiology* 5, 187-196.
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L., and Hayami, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *Journal of virology* 73, 6810-6820.
- Tanchou, V., Gabus, C., Rogemond, V., and Darlix, J.L. (1995). Formation of stable and functional HIV-1 nucleoprotein complexes in vitro. *Journal of molecular biology* 252, 563-571.
- Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., and Summers, M.F. (2004). Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 517-522.
- Tazi, J., Bakkour, N., Marchand, V., Ayadi, L., Aboufirassi, A., and Branlant, C. (2010). Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *The FEBS journal* 277, 867-876.
- Temsamani, J., and Vidal, P. (2004). The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug discovery today* 9, 1012-1019.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C.T., Sodroski, J., and Gottlinger, H.G. (1994). Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372, 363-365.
- Thomas, J.A., Gagliardi, T.D., Alvord, W.G., Lubomirski, M., Bosche, W.J., and Gorelick, R.J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* 353, 41-51.
- Thomas, J.A., and Gorelick, R.J. (2008). Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus research* 134, 39-63.
- Tiganos, E., Yao, X.J., Friberg, J., Daniel, N., and Cohen, E.A. (1997). Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *Journal of virology* 71, 4452-4460.
- Tisne, C., Roques, B.P., and Dardel, F. (2001). Heteronuclear NMR studies of the interaction of tRNA(Lys)³ with HIV-1 nucleocapsid protein. *Journal of molecular biology* 306, 443-454.
- Tisne, C., Roques, B.P., and Dardel, F. (2004). The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *The Journal of biological chemistry* 279, 3588-3595.
- Treiber, D.K., and Williamson, J.R. (2001). Beyond kinetic traps in RNA folding. *Current opinion in structural biology* 11, 309-314.
- Tremblay, M.J., Fortin, J.F., and Cantin, R. (1998). The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology today* 19, 346-351.
- Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., and Hill, F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *The EMBO journal* 11, 3405-3412.
- Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology* 285, 1-32.
- Turpin, J.A. (2003). The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental antiHIV drugs and targets. *Expert review of anti-infective therapy* 1, 97-128.

- Turpin, J.A., Schito, M.L., Jenkins, L.M., Inman, J.K., and Appella, E. (2008). Topical microbicides: a promising approach for controlling the AIDS pandemic via retroviral zinc finger inhibitors. *Advances in pharmacology* 56, 229-256.
- Turpin, J.A., Song, Y., Inman, J.K., Huang, M., Wallqvist, A., Maynard, A., Covell, D.G., Rice, W.G., and Appella, E. (1999). Synthesis and biological properties of novel pyridinioalkanoyl thiolesters (PATE) as anti-HIV-1 agents that target the viral nucleocapsid protein zinc fingers. *Journal of medicinal chemistry* 42, 67-86.
- Turpin, J.A., Terpening, S.J., Schaeffer, C.A., Yu, G., Glover, C.J., Felsted, R.L., Sausville, E.A., and Rice, W.G. (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. *Journal of virology* 70, 6180-6189.
- Turpin, J.A., Schito, M.L., Jenkins, L.M., Inman, J.K., and Appella, E. (2008). Topical microbicides: a promising approach for controlling the AIDS pandemic via retroviral zinc finger inhibitors. *Advances in pharmacology* 56, 229-256.
- Tijms, M.A., van der Meer, Y., and Snijder, E.J. (2002). Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *The Journal of general virology* 83, 795-800.
- Ueno, T., Tokunaga, K., Sawa, H., Maeda, M., Chiba, J., Kojima, A., Hasegawa, H., Shoya, Y., Sata, T., Kurata, T., *et al.* (2004). Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiology and immunology* 48, 111-118.
- Urbaneja, M.A., Kane, B.P., Johnson, D.G., Gorelick, R.J., Henderson, L.E., and Casas-Finet, J.R. (1999). Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *Journal of molecular biology* 287, 59-75.
- Urbaneja, M.A., Wu, M., Casas-Finet, J.R., and Karpel, R.L. (2002). HIV-1 nucleocapsid protein as a nucleic acid chaperone: spectroscopic study of its helix-destabilizing properties, structural binding specificity, and annealing activity. *Journal of molecular biology* 318, 749-764.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and H, G.G. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society transactions* 37, 181-184.
- Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptue, L., Gurtler, L.G., McArthur, C.P., Devare, S.G., *et al.* (2010). Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS research and human retroviruses* 26, 109-115.
- van Bel, N., Das, A.T., Cornelissen, M., Abbink, T.E., and Berkhout, B. (2014). A short sequence motif in the 5' leader of the HIV-1 genome modulates extended RNA dimer formation and virus replication. *The Journal of biological chemistry* 289, 35061-35074.
- Van Engelenburg, S.B., Shtengel, G., Sengupta, P., Waki, K., Jarnik, M., Ablan, S.D., Freed, E.O., Hess, H.F., and Lippincott-Schwartz, J. (2014). Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. *Science* 343, 653-656.
- VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., and Carter, C.A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7724-7729.

- Vink, C., van Gent, D.C., Elgersma, Y., and Plasterk, R.H. (1991a). Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. *Journal of virology* 65, 4636-4644.
- Vink, C., Yeheskiely, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., and Plasterk, R.H. (1991b). Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic acids research* 19, 6691-6698.
- Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of biological chemistry* 272, 16010-16017.
- Vodicka, M.A. (2001). Determinants for lentiviral infection of non-dividing cells. *Somatic cell and molecular genetics* 26, 35-49.
- Vogt, V.M. (1996). Proteolytic processing and particle maturation. *Current topics in microbiology and immunology* 214, 95-131.
- Votteler, J., and Sundquist, W.I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell host & microbe* 14, 232-241.
- Vuilleumier, C., Bombarda, E., Morellet, N., Gerard, D., Roques, B.P., and Mely, Y. (1999). Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry* 38, 16816-16825.
- Waheed, A.A., and Freed, E.O. (2012). HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS research and human retroviruses* 28, 54-75.
- Wallace, G.S., Cheng-Mayer, C., Schito, M.L., Fletcher, P., Miller Jenkins, L.M., Hayashi, R., Neurath, A.R., Appella, E., and Shattock, R.J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibitors impede trans infection in cellular and explant models and protect nonhuman primates from infection. *Journal of virology* 83, 9175-9182.
- Wang, J., Smerdon, S.J., Jager, J., Kohlstaedt, L.A., Rice, P.A., Friedman, J.M., and Steitz, T.A. (1994). Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7242-7246.
- Wang, S.H., Syu, W.J., Huang, K.J., Lei, H.Y., Yao, C.W., King, C.C., and Hu, S.T. (2002). Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *The Journal of general virology* 83, 3093-3102.
- Warui, D.M., and Baranger, A.M. (2009). Identification of specific small molecule ligands for stem loop 3 ribonucleic acid of the packaging signal Psi of human immunodeficiency virus-1. *Journal of medicinal chemistry* 52, 5462-5473.
- Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C.L., and Weeks, K.M. (2009). Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460, 711-716.
- Wieggers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., and Krausslich, H.G. (1998). Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *Journal of virology* 72, 2846-2854.
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.

- Wilk, T., Gowen, B., and Fuller, S.D. (1999). Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *Journal of virology* 73, 1931-1940.
- Wollert, T., Yang, D., Ren, X., Lee, H.H., Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2009). The ESCRT machinery at a glance. *Journal of cell science* 122, 2163-2166.
- Woodward, C.L., Cheng, S.N., and Jensen, G.J. (2015). Electron cryotomography studies of maturing HIV-1 particles reveal the assembly pathway of the viral core. *Journal of virology* 89, 1267-1277.
- Wu, J.Q., Ozarowski, A., Maki, A.H., Urbaneja, M.A., Henderson, L.E., and Casas-Finet, J.R. (1997). Binding of the nucleocapsid protein of type 1 human immunodeficiency virus to nucleic acids studied using phosphorescence and optically detected magnetic resonance. *Biochemistry* 36, 12506-12518.
- Wu, T., Datta, S.A., Mitra, M., Gorelick, R.J., Rein, A., and Levin, J.G. (2010). Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications. *Virology* 405, 556-567.
- Wu, W., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Rein, A., and Levin, J.G. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *Journal of virology* 70, 7132-7142.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J.A., Hehl, E., Kalpana, G.V., Prasad, V., and Kappes, J.C. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *Journal of virology* 73, 2126-2135.
- Wu, Y., and Marsh, J.W. (2003). Gene transcription in HIV infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 1023-1027.
- Wurm, T., Chen, H., Hodgson, T., Britton, P., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *Journal of virology* 75, 9345-9356.
- Yamaguchi, J., Bodelle, P., Kaptue, L., Zekeng, L., Gurtler, L.G., Devare, S.G., and Brennan, C.A. (2003). Near full-length genomes of 15 HIV type 1 group O isolates. *AIDS research and human retroviruses* 19, 979-988.
- Yang, O.O., Nguyen, P.T., Kalams, S.A., Dorfman, T., Gottlinger, H.G., Stewart, S., Chen, I.S., Threlkeld, S., and Walker, B.D. (2002). Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 76, 1626-1631.
- You, J.C., and McHenry, C.S. (1994). Human immunodeficiency virus nucleocapsid protein accelerates strand transfer of the terminally redundant sequences involved in reverse transcription. *The Journal of biological chemistry* 269, 31491-31495.
- You, J., Dove, B.K., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Howell, G., Heinen, P., Zambon, M., and Hiscox, J.A. (2005). Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *The Journal of general virology* 86, 3303-3310.
- Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H., and Bieniasz, P.D. (2004). APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of virology* 78, 12058-12061.

- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* *101*, 173-185.
- Zhang, J., and Crumpacker, C.S. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein nuclear localization mediates early viral mRNA expression. *Journal of virology* *76*, 10444-10454.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., et al. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell host & microbe* *4*, 495-504.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., et al. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell host & microbe* *4*, 495-504.
- Zhou, M., Deng, L., Kashanchi, F., Brady, J.N., Shatkin, A.J., and Kumar, A. (2003). The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 12666-12671.
- Zhu, K., Dobard, C., and Chow, S.A. (2004). Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *Journal of virology* *78*, 5045-5055.
- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 15812-15817.
- Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C., and Lingappa, J.R. (2002). Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* *415*, 88-92.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* *72*, 9873-9880.
- Zuniga, S., Sola, I., Cruz, J.L., and Enjuanes, L. (2009). Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus research* *139*, 253-266.

Distribution cellulaire de la protéine de la nucléocapside NCp7 du VIH-1 et caractérisation de son interaction avec la protéine nucléolaire hNoL12

Résumé

La protéine de nucléocapside (NC) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) joue un rôle majeur dans les différentes étapes du cycle viral du VIH-1 : soit comme domaine fonctionnel de la polyprotéine Gag (NC-Gag) dans les phases tardives du cycle viral, soit sous sa forme mature NCp7 dans les phases précoces. Afin de mieux comprendre le rôle de la forme mature dans le cycle viral, nous avons cherché de nouveaux partenaires cellulaires spécifiques de la NCp7 et identifié la protéine nucléolaire, hNoL12, impliquée dans la maturation des ARNs ribosomiaux. L'interaction NCp7/hNoL12 a été confirmée par co-IP, FRET-FLIM et double hybride chez la levure et le domaine d'interaction a été localisé entre les a.a. 22 et 61 correspondant au domaine 5'-3'-exonucléase de hNoL12. Nous avons développé un test pour caractériser cette activité et montré qu'elle est spécifique des ARN simples brins. Enfin, l'extinction de l'expression de hNoL12 entraîne une diminution significative de l'infection par un lentivecteur modèle des phases précoces de l'infection soulignant l'implication fonctionnelle de hNoL12 dans cette phase de l'infection. Dans un second projet, nous nous sommes intéressés au devenir de la NCp7 dans les cellules infectées, suite à la transcription inverse. Nous avons généré des vecteurs lentiviraux composés de protéines NCp7 fusionnées à une étiquette tétracysteine permettant son marquage spécifique avec le dérivé de la fluorescéine (FIAsh). Nous avons alors étudié, par microscopie confocale, la distribution intracellulaire de la NCp7 dans des conditions proches de l'infection. Nos résultats indiquent qu'une grande partie de la NCp7 se dissocie du PIC durant son transport dans le cytoplasme. Toutefois, la perte de la NCp7 est une étape tardive qui se déroule proche du noyau confirmant ainsi que la décapsidation a lieu à la membrane nucléaire juste avant l'entrée du complexe de préintégration dans le noyau. Le troisième projet a porté sur le développement d'antiviraux ciblant la NCp7. Nous avons travaillé sur la vectorisation et la caractérisation des propriétés antivirales en milieu cellulaire, d'un peptide sélectionné *in vitro* pour sa capacité à inhiber l'action chaperonne de la NCp7. L'activité antivirale du peptide vectorisé vis-à-vis d'une infection par un vecteur lentiviral basé sur le VIH-1 s'est révélée décevante.

Mots clés : VIH, nucléocapside, NCp7, hNoL12, exonucléase, lentivecteur, FIAsh

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) nucleocapsid protein (NC) plays a major role in the different steps of the viral lifecycle under its two forms; either as a domain of the polyprotein Gag (NC-Gag) in the late phase or as a mature NCp7 protein in the early phase. In order to better understand the role of the mature form in the viral cycle, we searched for new NCp7 specific cellular partners and identified the nucleolar protein hNoL12 which is known to be involved in the maturation of ribosomal RNAs. The NCp7/hNoL12 interaction was confirmed by co-IP, FRET-FLIM, and yeast two hybrid. The interaction domain was localized between a.a. 22 and 61 on hNoL12; which corresponds to its putative 5'-3'-exonuclease domain. We developed an assay to monitor this activity and found it to be specific of single strand RNA. Finally, the cellular knockdown of hNoL12 resulted in a significant decrease in the infection by a pseudovirus mimicking the early phase of the infection, emphasizing the functional involvement of hNoL12 in this phase. In a second project, we were interested in the fate of the viral incoming NCp7 in the infected cells, after reverse transcription. We thus generated lentiviral vectors composed of NCp7 fused to a tetracysteine tag enabling its specific labeling with the fluorescein derivative FIAsh. We then studied by confocal microscopy, the intracellular distribution of NCp7 containing viral particles in conditions close to the infection. Our results showed that an important proportion of the NCp7 molecules dissociates from the PIC during its transport in the cytoplasm. However, the loss of NCp7 is a late step of this process and seems to take place close to the nucleus suggesting that the dissociation of the capsid occurs at the nuclear membrane just before the nuclear entry of the PIC. The third project concerns the development of antiviral inhibitors targeting NCp7. We worked on the vectorization and the characterization of the antiviral properties of a peptide selected *in vitro* for its ability to inhibit the NCp7 chaperone activity. The inhibitory activity of the vectorized peptide on infection of HeLa cells by a HIV-1 based lentiviral vector was found deceiving.

Key words: HIV, nucleocapsid, NCp7, hNoL12, exonuclease, lentivector, FIAsh