



HAL
open science

Etude de la nano-organisation dynamique de la protéine Gag du VIH-1 à la membrane plasmique des Lymphocytes T CD4+ au cours de l'assemblage viral

Charlotte Floderer

► To cite this version:

Charlotte Floderer. Etude de la nano-organisation dynamique de la protéine Gag du VIH-1 à la membrane plasmique des Lymphocytes T CD4+ au cours de l'assemblage viral. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT075 . tel-02987639

HAL Id: tel-02987639

<https://theses.hal.science/tel-02987639>

Submitted on 4 Nov 2020

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale n°168 CBS2

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche CPBS-CNRS

Spécialité : Virologie humaine et nanoscopie dynamique

Présentée par Charlotte Floderer

**Etude de la nano-organisation dynamique de la protéine
Gag du VIH-1 à la membrane plasmique des Lymphocytes
T CD4+ au cours de l'assemblage viral**

Soutenue le 15 décembre 2016 devant le jury composé de

Dr. Olivier THOUMINE, Directeur de Recherche, IINS Bordeaux	Rapporteur
Dr. Clarisse BERLIOZ-TORRENT, Directeur de Recherche, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
Dr. Cécile GAUTHIER-ROUVIERE, Directeur de Recherche, CRBM, Montpellier	Présidente du jury
Dr. Andrea CIMARELLI, Directeur de Recherche, CIRI, Lyon	Membre du jury
Dr. Jean-Baptiste SIBARITA, Ingénieur de Recherche, IINS , Bordeaux	Jury invité
Dr. Delphine MURIAUX, Directeur de Recherche, CPBS, Montpellier	Directrice de thèse
Dr. Cyril FAVARD, Ingénieur de Recherche, CPBS, Montpellier	Co-encadrant de thèse



RÉSUMÉ

La formation des particules virales est l'une des cibles possibles pour un traitement efficace contre le SIDA. Ce processus est le résultat de l'assemblage de la protéine rétrovirale Gag au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique de la cellule infectée. La protéine Gag du VIH-1 est le composant majeur pour l'assemblage viral car il est suffisant pour produire de nouveaux virions, appelés pseudo-particules virales (VLP). Nous avons étudié la dynamique d'assemblage de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des Lymphocytes T, en utilisant le suivi de protéines uniques associé à la microscopie par localisations photoactivées (sptPALM) en illumination TIRF. Cette étude a été faite dans le modèle cellulaire Jurkat, une lignée lymphocytaire humaine, car les cellules T sont les cibles majoritaires du VIH-1. Cette méthode de microscopie de super-résolution donne accès à la distribution spatiale du Gag-(i)mEOS2 à l'échelle nanométrique où les plateformes d'assemblages sont détectables individuellement. Nous avons donc étudié la morphologie de ces plateformes, et observé leur évolution temporelle grâce à la reconstruction des trajectoires de Gag. Nous avons constaté que la morphologie de plateformes de Gag ne change pas même lorsque la multimérisation est altérée, bien que le défaut de multimérisation altère la capacité du Gag à produire des VLPs. La protéine Gag diffuse principalement sous forme de multimères une fois ancrée à la membrane, et les plateformes d'assemblage agissent comme un champ de force attractives où les protéines Gag sont piégées en tant qu'agrégat protéique stable et non-diffusif. Nos résultats tendent à montrer que l'ARN pourrait être un élément nécessaire à un assemblage productif. En effet, l'incapacité du Gag à recruter l'ARN cellulaire ou viral inhibe la formation de plateformes d'assemblage, et la production de VLP. Pris dans leur ensemble, nos résultats donnent accès à de nouveaux détails quant à la dynamique d'assemblage de Gag du VIH-1 dans les Lymphocytes T CD4, cellules hôtes majeures du virus, et améliorent notre connaissance des étapes tardives de la biogénèse du VIH-1.

Mots clés : VIH-1, assemblage, nanoscopie dynamique

ABSTRACT

The newly formed HIV-1 particles are one of the possible targets for an efficient cure against AIDS. This process is due to the assembly of the retroviral Gag protein at the inner leaflet of the infected cell plasma membrane. HIV-1 Gag is the most important component for assembly as it is sufficient to produce newly formed particles, called virus-like particles (VLP). Here, we study the assembly of Gag-i(mEOS2) protein dynamic organization, at the nanometric level, using single-protein tracking Photoactivable Localization microscopy (sptPALM) coupled to TIRF microscopy, to analyze its dynamic at the plasma membrane of Jurkat T cells. This study is done in Jurkat T model cell line, as $CD4^+$ T lymphocytes are the main target of HIV-1 and the privileged cell type for HIV replication. This super-resolution microscopy method gives access to the spatial distribution of Gag-i)mEOS2 at the nanometric scale where assembly platforms made of Gag are distinguishable. We studied the morphology of those platforms, and observed them evolving in time thanks to the Gag trajectories reconstruction. We found that HIV-1 Gag platforms morphology doesn't change even when multimerization is altered, but the ability of Gag to form VLP is largely impaired, leading to a defect of VLP release. HIV-1 Gag diffuses mainly as multimers once anchored at the membrane, and assembly platforms act as an attractive force field where Gag protein are trapped as non-diffusive, stable aggregate. The RNA seems to be necessary for a productive assembly process, as the inability of Gag to recruit cellular or viral RNA annihilate the assembly platform formation, and VLP release. Altogether, our results give access to new details about HIV-1 Gag assembly dynamic in its natural host cell and then improve our knowledge about the late stage of HIV-1 biogenesis.

Key words : Hiv-1, assembly, dynamic nanoscopy

Je souhaite tout d'abord remercier Dr. Jean-Michel Mesnard, directeur du CPBS, pour offrir à tout le personnel de l'Institut un cadre professionnel si agréable et dynamique.

Je remercie le Dr. Michel Désarmenien, directeur de l'école doctorale CBS2, pour mettre en place de nombreuses solutions pour aider tous les doctorants de son école dans cette aventure qu'est le doctorat. Je souhaite remercier également Mme Sandrine Urvoy, secrétaire et gestionnaire de l'école doctorale CBS2 pour son aide constante concernant les démarches associées au doctorat.

Je souhaite remercier le Dr. Delphine Muriaux, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de travailler sur un projet de recherche aussi passionnant. Merci d'avoir tout fait pour faire vivre ce projet grâce à ces merveilleuses collaborations et de m'avoir donné tous les moyens nécessaires à son aboutissement. Et enfin, merci de m'avoir donné l'occasion d'aller présenter mes travaux à des congrès nationaux et internationaux où j'ai appris tellement. Je remercie également le Dr. Cyril Favard, co-encadrant de ma thèse, pour m'avoir appris à appréhender la biophysique et ses enjeux dans le domaine de la microscopie et des interactions protéiques. Merci pour tes précieux conseils et du temps que tu donnes sans compter dès que nous avons une question.

Je remercie mes rapporteurs, Dr. Clarisse Berlioz-Torrent et Dr. Olivier Thoumine, qui ont pris beaucoup de temps et de soin pour corriger et améliorer mon manuscrit de thèse. Je remercie le Dr. Clarisse Berlioz-Torrent, pour m'avoir permis d'améliorer grandement ce manuscrit, en clarifiant mon discours et me donner des méthodes précieuses pour le reste de ma carrière. Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse et également membres de mon comité de thèse, les Drs. Cécile Gauthier-Rouvière et Andrea Cimarelli, pour avoir accepté de juger mon travail durant ces trois années, pour leurs conseils et leurs idées précieuses.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr. Jean-Baptiste Sibarita pour le temps qu'il a pris pour me former, m'aider, me conseiller et m'encourager. Je le remercie avec force pour m'avoir fait tomber dans la marmite de la microscopie de super-résolution, un domaine que je compte bien explorer encore et encore! Merci pour tout JB! Et comme dirait Rocky, "It ain't about how hard you're hit, it's about how much you can take and keep moving forward. Get up!" [Sivester Stalone, Rocky Balboa, 2006]. Merci aussi à tous les membres de ton équipe, et particulièrement à Corey pour être toujours resté avec moi quand je devais partir tard, et pour m'avoir appris pleins de choses. Mais aussi pour les moments au Petit Quebec! Merci également à Anne, pour ses conseils, sa gentillesse et pour m'avoir laissé son microscope à chaque fois que je suis venue!

Je remercie mes acolytes de thèse : Coralie, tu a été mon rayon de soleil quotidien. Je te remercie pour ton soutien, ta présence, ta bonne humeur et ta joie de vivre. J'ai adoré évoluer avec toi pendant cette aventure. Je te remercie pour tous les "trucs et astuces" que l'on a partagé durant nos thèses, tant scientifiquement que personnellement. Tu es et a été ma Felix Felicis! Je remercie Eric, pour toutes nos discussions, scientifiques ou non, tes conseils précieux et ton aide pour la biologie moléculaire! Je te remercie pour ta constance qui rassure, ton soutien, pour m'avoir donné l'exemple à suivre. Tes conseils et ta disponibilité en toutes circonstances. Et les petits chats. Et tes T-shirts... :D

Merci à mes collègues de l'équipe: Naresh, pour tes maximes et dictons indiens, qui apportent un regard philosophique sur les événements de la vie. Ton regard sur le monde est apaisant, et j'ai toujours pris beaucoup de plaisir à discuter avec toi. Merci à Shantoshini (ou Shanto, ou Shini, ou Cutest Girl Ever) pour être une personne aussi douce et merveilleuse. Ça a été merveilleux de finir ma thèse à tes côtés, et je compte bien continuer à partager autant de moments si précieux avec toi! "Glitter Power!". Je souhaite remercier également Peggy, tu as été un don du ciel pour reprendre le flambeau de l'organisation et la gestion du labo! Ton implication et ton attention portée à tous est vrai un bol d'air! Et c'est tellement agréable de travailler avec toi, grâce à ta bonne humeur, ton humanité et ton énergie! Je remercie également Nathalie, avec qui j'ai adoré travailler. Merci d'avoir apporté un peu de pragmatisme et de rationalité lorsque tu étais au labo avec nous. J'ai adoré travailler avec toi et nos manips en binôme. Tu es la collègue dont tout le monde rêve. Je remercie enfin Adeline qui m'a montré la voie de la persévérance quelque soit les conditions. Tu as été celle qui m'a accueilli et formé sur les bonnes pratiques de laboratoire. Merci pour avoir toujours été là, même quand c'était pas facile pour toi, et même après être partie à Londres.

Je remercie également Lucille pour son soutien, son optimisme et son énergie et nos échanges si enrichissants. Je remercie Caroline, pour ses encouragements et sa disponibilité. C'est aussi grâce à vous que j'en suis arrivée là!

Je souhaite remercier tous les doctorants et post-doctorants du CPBS. Malvina pour nos discussions pour essayer de comprendre notre monde et à le refaire à notre manière, et nos déconnades. Célia, Marie, Malvina, on l'ouvrira un jour notre ferme collaborative cachée en Ardèche! Roy, le cousin! Un mot, un regard au détours d'un couloir suffisait à balayer les aléas de notre quotidien!

Je souhaite remercier également tous les membres du CPBS, qui sont tous ouverts, gentils et bienveillants. Je souhaite remercier particulièrement Pascale, qui est toujours prête à tout pour nous aider et améliorer notre quotidien. Pierre, Christine, Martine, Sandrine et Corinne, qui sont nos héros du quotidien pour nous aider dans toutes les démarches administratives!! Martine et Christine, vous m'avez sauvée bien des fois! Merci!

Je souhaite remercier tout particulièrement Arnaud pour avoir cru en moi, pour ton soutien et ta patience quotidienne. Tu as su trouver les mots pour me rassurer, m'encourager. Tu as été mon roc, tu m'as apporté bonheur et amour durant ces trois ans, contre vents et marées. Et merci d'avoir corrigé l'orthographe de ce manuscrit! Cette thèse, j'en partage les fruits avec toi.

Mamadine et mon Da, je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir soutenu et accompagné jusque là. Et Léa, ma soeur, mon Bambi! Tout est dit. Nous sommes maintenant tous des Flo! Notre cocon à 4, et maintenant à 6, est une vraie force, et source de bonheur.

Et enfin tous mes amis, Dim et Céline, Guillaume et Malika, Audrey, Ma Nanoue, Morgane, Claire, Mathieu, Maxence... pour m'avoir offert des échappés fabuleuses.

Et un petit mot spécial pour notre petit Tsuki!

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIERES	VI
ABBREVIATIONS	X
LISTE DES FIGURES ET TABLES	XII
AVANT-PROPOS	XVII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1	3
1. Le virus de l'immunodéficience humaine : origine et caractéristiques	3
1.1. Le SIDA: épidémiologie et prévalence	3
1.2. Classification du HIV	3
1.3. Diversité génétique du VIH	3
1.4. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1	5
1.4.1. <i>Structure de la particule virale</i>	5
1.4.2. <i>Le tropisme viral</i>	7
1.5. Le génome viral	7
1.6. Les protéines de structure du VIH-1	9
1.6.1. <i>La matrice M_{Ap}17</i>	11
1.6.2. <i>La capsid C_{Ap}24</i>	11
1.6.3. <i>La nucléocapside N_{Cp}7</i>	13
1.7. Le cycle réplicatif du VIH-1	13
1.7.1. <i>Les étapes précoces de la réplication virale</i>	13
1.7.2. <i>Les étapes tardives de la réplication virale</i>	17
1.8. Les protéines régulatrices et accessoires	23
1.8.1. <i>Nef</i>	23
1.8.2. <i>Vif</i>	25
1.8.3. <i>Vpu</i>	27
1.8.4. <i>Vpr</i>	27
2. L'assemblage du VIH-1	29
2.1. Le précurseur protéique Gag	29
2.1.1. <i>Le domaine MA : domaine d'interactions aux membranes</i>	31

2.1.2. Le domaine CA: domaine d'interaction Gag-Gag	31
2.1.3. Le peptide d'espacement sp1	33
2.1.4. Le domaine NC	33
2.1.5. Le peptide d'espacement sp2	35
2.1.6. Le domaine p6.....	35
2.2. La localisation cellulaire de Gag.....	39
2.2.1. Les facteurs influençant la localisation cellulaire de Gag	39
2.2.2. Les interactions membranaires et le rôle des lipides dans l'assemblage viral	47
2.3. La dynamique cytosolique et membranaire de Gag.....	49
2.4. Assemblage et domaines membranaires.....	53
2.5. L'encapsidation de l'ARNv.....	57
2.6. L'incorporation des protéines d'enveloppe.....	59
2.7. Le rôle des cofacteurs cellulaires dans les étapes tardives de la réplication virale.....	61
2.7.1. La libération ESCRT-dépendante de la particule virale.....	61
2.7.2. Le rôle des co-facteurs cellulaires dans l'assemblage viral.....	63
CHAPITRE 2 : LA NANOSCOPIE DYNAMIQUE	67
1. De la microscopie à la nanoscopie	67
2. La microscopie de fluorescence	67
2.1. La lumière	67
2.2. La fluorescence	69
2.3. Les protéines photo-convertibles : exemple de la protéine mEOS2.....	69
2.3.1. Les sondes photo-convertibles	69
2.3.2. Structure de la mEOS2	69
2.3.3. Les spectres d'excitation et d'émission de la mEOS2.	69
2.4. La résolutions : enjeu majeur de la microscopie	71
3. La nanoscopie dynamique : focus sur le sptPALM	73
3.1. Le principe du PALM	73
3.1.1. La microscopie par illumination TIRF.....	73
3.1.2. L'acquisition.....	75
3.1.3. La localisation.....	75
3.2. La reconstruction de trajectoires : le sptPALM.....	79
3.3. L'analyse des données sptPALM	79
3.3.1. Le déplacement quadratique moyen (MSD).....	79
3.3.2. Les différents types de mouvements	81
3.3.3. L'analyse par Inférence Bayésienne du suivi de protéines uniques.....	81

OBJECTIFS DE THESE.....	85
--------------------------------	-----------

RESULTATS : ETUDE DE LA NANO-ORGANISATION DYNAMIQUE DE LA PROTEINE GAG DU VIH-1 A LA MEMBRANE PLASMIQUE DES LYMPHOCYTES T CD4⁺89

1. Caractérisation de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants	91
1.1. Présentation des mutants.....	91
1.2. Expression de Gag-(i)mEOS2 et production virale dans les cellules T	97
1.2.1. <i>Expression intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 par FACS</i>	97
1.2.2. <i>Analyse de la production virale de Gag-(i)mEOS2 et de ses dérivés</i>	101
1.3. Localisation intracellulaire de Gag-mEOS2 de ses dérivés	103
1.4. Analyse de l'accrochage membranaire de Gag-mEOS2	105
1.5. Conclusion	111
2. Stratégie d'analyse de la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T	113
3. Etude de la morphologie des plateformes d'assemblage induites par Gag-(i)mEOS2 par PALM/TIRF	115
3.1. Observation de Gag-mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T.....	115
3.2. La morphologie des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2	119
3.2.1. <i>Le diamètre des plateformes d'assemblage</i>	119
3.2.2. <i>La sphéricité des plateformes d'assemblage</i>	123
3.3. Conclusion et discussion	127
4. Etude de la diffusion de la Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des Lymphocytes T.....	133
4.1. Etude de la distribution des coefficients de diffusion de Gag-(i)mEOS2.....	135
4.1.1. <i>La distribution des coefficients de diffusion</i>	135
4.1.2. <i>Proportions des différentes dynamique à la membrane</i>	137
4.2. Les distributions des coefficients de diffusion de Gag-(i)mEOS2 au sein d'une plateforme d'assemblage.....	141
4.3. Conclusion et discussion	143
5. Etude du processus de formation des plateformes d'assemblage dans le temps et l'espace	149
5.1. Etude de la capacité de Gag-(i)mEOS2 à générer un champ de forces lors de l'assemblage viral	151
5.1.1. <i>Le suivi de la formation d'une plateforme d'assemblage</i>	151

5.1.2. <i>Etude des fluctuations d'énergie potentielle dans le temps et l'espace</i>	155
5.2. Automatisation de l'inférence Bayésienne	157
5.3. Conclusion et discussion	163

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES167

MATERIEL ET METHODES181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES193

ANNEXES213

Annexe 1 : Publication de l'image du mois dans le journal AIDS Research and Human retroviruses215

Annexe 2 : Contribution à la publication d'un article sur l'implication de la voie de signalisation IRSp53/Wave2/Arp2-3 dans la production virale dans les Lymphocytes T221

Annexe 3 : Publication d'une mini-revue sur le rôle de Gag et des lipides durant l'assemblage du VIH dans les cellules T CD4+ et les macrophages.....243

Annexe 4 : Liste des participation à des congrès internationaux : posters et présentations...256

ABBREVIATIONS

ABCE1 : ATP binding cassette protein E1
ADN : acide désoxyribo-nucléique
ALIX : ALG-2interacting protein X
AP-1/2/3 : activator protein 1/2/3
ARN : acide ribo-nucléique
ARNv : ARN génomique viral
BAF : barrier-to-autointegration factor
CA : capsid
CCD : catalytic core domain
CRF : circulating recombinant form
CRM1 : chromosomal maintenance 1 (aussi connu sous Exportin 1)
CTD : c-terminal domain
DIS : dimer initiation site
env : enveloppe
ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
gag : group-specific antigen
HAART : Highly Active Antiretroviral therapies
HBR : Highly basic region
IN : integrase
LTR : Long terminal repeat
MA : Matrice
MHR : major homology region
NC : nucléocapside
Nef : Negative Regulatory Factor
NTD : N-terminal domain
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : primer binding site
PI : phosphoinositide
PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
pol : polymerase
PR : protéase
PS : phosphatidyl sérine
P-TEFb : positive transcription elongation factor
Rev : Regulator of Virion protein expression
RRE : Rev response element
RT : reverse transcriptase

SIDA : Syndrome d'immunodéficience humaine de type 1
SIV : Simian immunodeficiency virus
SM : sphingomyeline
SMLM : single molecule localization microscopy
sptPALM : single particle tracking Photoactivated Localization Microscopy
STED : Stimulated Emission Depletion
STORM : Stochastic Optical reconstruction microscopy
SUgp120 : Surface glycoprotein 120
TAR : trans-activation region
Tat : Trans-Activator of Transcription
TIRF : Total internal reflection fluorescence
TMgp41: TransMembrane glycoprotein 41
tRNA : ARN de transfert
Tsg101 : Tumor susceptibility gene 101
UPS : ubiquitin/proteasom system
Vif : Virion infectivity factor
VIH : Human immunodeficiency virus
VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine
VLP : Virus like particle
Vpr : Viral protein R
VPS : vacuolar protein sorting
Vpu : viral protein C
WT : wild type

LISTE DES FIGURES ET TABLES

- Figure 1 Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH dans le monde en 2014
- Figure 2 Arbre phylogénétique représentant les différents groupes du VIH/SIV
- Figure 3 Schéma de la structure du VIH-1 et sections représentatives par cryo-électrotomographie
- Figure 4 Cinétique d'infection du VIH-1
- Figure 5 Organisation du génome du VIH-1
- Figure 6 Structure de l'extrémité 5' de l'ARNv du VIH-1
- Figure 7 Structure tertiaire de la protéine de matrice M_{Ap}17
- Figure 8 Représentation schématique des interactions entre les protéines de capsid et de la structure fullerène de la capsid virale
- Figure 9 Structure tertiaire de la nucléocapsid NC_{p7}
- Figure 10 Schéma du cycle de réplication du VIH-1
- Figure 11 Structure des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1
- Figure 12 Structure tertiaire de la reverse transcriptase du VIH-1
- Figure 13 Organisation des domaines de l'intégrase du VIH-1 et structure tertiaire
- Figure 14 Schéma du profil d'épissage des ARNm transcrits à partir du provirus du VIH-1
- Figure 15 Synthèse et trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1
- Figure 16 Structure de la protéase PR mature du VIH-1
- Figure 17 Précurseur pr55Gag : structure et fonctions de ses différents domaines
- Figure 18 Phénotype des pseudo-particules virales produites par la protéine Gag WT et par la protéine Gag mutée au niveau du site de dimérisation de la capsid
- Figure 19 Modèle du changement de conformation de sp1 durant l'assemblage
- Figure 20 Structure du domaine NC de Gag et de la séquence signal Psi de l'ARNv du VIH-1
- Figure 21 Phénotype des bourgeons viraux formés lors de l'induction de l'arrêt du bourgeonnement viral
- Figure 22 Modèle de régulation de l'interaction de Gag aux membranes via l'ARN
- Figure 23 Modèle du changement d'interactions entre Gag et les ARNs durant la genèse virale
- Figure 24 Schéma de l'arrangement moléculaire de Gag en interaction avec la membrane au sein d'une particule assemblée immature
- Figure 25 Simulation informatique de l'orientation du domaine MA à la surface de la membrane en interaction avec le PIP₂
- Figure 26 Modèle illustrant l'interaction dynamique des différentes espèces de Gag
- Figure 27 Schéma des comportements séquentiels des composants viraux et cellulaires durant l'assemblage du VIH-1
- Figure 28 Changements conformationnels de l'ARNv régulant sa traduction ou sa dimérisation

LISTE DES FIGURES

- Figure 29 Modèles de scission membranaire médiée par les complexes ESCRTIII
- Figure 30 Spectre électromagnétique de la lumière
- Figure 31 Diagramme simplifié de Jablonski
- Figure 32 Spectres d'émission et d'excitation de la protéine mEOS2
- Figure 33 Schéma de la diffraction de la lumière
- Figure 34 Représentation des disques d'Airy
- Figure 35 Critère de Rayleigh et pouvoir séparateur du système optique
- Figure 36 Schéma du principe d'illumination par microscopie TIRF
- Figure 37 Principe du PALM
- Figure 38 Localisation d'une particule fluorescente grâce à l'ajustement gaussien et différence entre précision de pointée et pouvoir séparateur
- Figure 39 Localisation par décomposition par ondelettes
- Figure 40 Principe d'acquisition et de reconstruction des trajectoires par sptPALM
- Figure 41 Suivi de protéines uniques et déplacement quadratique moyen
- Figure 42 Représentation schématique de l'approche d'inférence Bayésienne
- Figure 43 Description du mouvement des protéines par l'équation de Langevin
- Figure 44 Schéma des constructions de Gag-(i)mEOS2 réalisées et leur impact sur les étapes d'assemblage du VIH-1
- Figure 45 Expression des constructions de Gag-(i)mEOS2 et de ses dérivés en Jurkat par FACS
- Figure 46 Analyse de la production virale de Gag-(i)mEOS2 par Western Blot
- Figure 47 Localisation intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 et de ses dérivés dans les Jurkat par microscopie confocale
- Figure 48 Accrochage membranaire obtenu en Jurkat exprimant Gag/GagPol grâce plasmide p8.2 et quantité de Gag-(i)mEOS2 retrouvée dans la fraction membranaire et cytosolique (PNS) par rapport au culot nucléaire
- Figure 49 Accrochage membranaire obtenu en 293T exprimant le plasmide pGag-(i)mEOS2
- Figure 50 Schéma de la stratégie d'étude de l'organisation moléculaire dynamique de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T CD4+
- Figure 51 Acquisition en PALM/TIRF de Gag-(i)mEOS2 WT
- Figure 52 Schéma de l'évolution de l'assemblage de la protéine Gag-(i)mEOS2
- Figure 53 Organisation spatiale des protéines Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T Jurkat par TIRF/PALM
- Figure 54 Schéma de l'ajustement gaussien utilisé pour calculer le diamètre des plateformes d'assemblage
- Figure 55 Distributions des diamètres des plateformes d'assemblage à l'extérieur de la cellule et associées à la membrane cellulaire
- Figure 56 Représentation des fréquences cumulées des tailles des clusters de chaque condition et de la proportion de chaque population

LISTE DES FIGURES

- Figure 57 Schéma de l'ajustement anisotrope gaussien sur une plateforme non sphérique
- Figure 58 Distribution de la sphéricité des plateformes d'assemblage
- Figure 59 Relation entre la taille et la sphéricité des plateformes d'assemblage
- Figure 60 Illustration du biais possible de l'ajustement gaussien dû à la proximité de deux plateformes d'assemblage
- Figure 61 Densité des plateformes d'assemblage à la membrane des cellules
- Figure 62 Image de super-résolution des Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T vivants et les trajectoires reconstruites analysées
- Figure 63 Moyenne d'intensité de fluorescence des cellules analysées et nombre moyen de trajectoires >200ms
- Figure 64 Distribution des coefficients de diffusion des cellules étudiées pour chaque condition
- Figure 65 Représentation des différentes populations de dynamique des cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 dp6
- Figure 66 Distributions moyennes des coefficients de diffusion
- Figure 67 Distributions de chaque population de dynamique
- Figure 68 Proportion des populations mobiles, intermédiaires et immobiles des protéines Gag-(i)mEOS2
- Figure 69 Suivi d'une plateforme d'assemblage dans le temps
- Figure 70 Distribution des coefficients de diffusion au sein des plateformes d'assemblage
- Figure 71 Distribution de chaque population de dynamique de Gag au sein des plateformes d'assemblage
- Figure 72 Proportion de chaque type de dynamique à l'intérieur des plateformes d'assemblage
- Figure 73 Partitionnement spatial de la surface cellulaire
- Figure 74 Suivi des paramètres obtenus par l'analyse des trajectoires grâce à l'équation de Langevin dans le temps et l'espace
- Figure 75 Suivi de la formation d'une plateforme d'assemblage au cours du temps
- Figure 76 Comparaison des fluctuations d'énergie calculées pour l'état 0 (protéines immobiles) et pour l'état 1 (protéines mobiles)
- Figure 77 Fluctuations spatiales et temporelles de l'énergie potentielle de Gag-(i)mEOS2 lors de la formation d'une plateforme d'assemblage
- Figure 78 Evolution de l'énergie potentielle dans le temps au centre des plateformes d'assemblage
- Figure 79 Différences d'énergie potentielle maximale
- Figure 80 Découpage temporel automatisé des plateformes d'assemblage : exemple pour Gag-(i)mEOS2 WT et MACA
- Figure 81 Distribution des maxima des différences d'énergie potentielle et proportions des différentes populations de puits énergétiques
- Figure 82 Durée des processus d'assemblage de Gag-(i)mEOS2
- Figure 83 Représentation des populations de plateformes selon la durée du processus d'assemblage et l'énergie potentielle mise en jeu

LISTE DES FIGURES

- Figure 84 Schéma bilan : Dynamique de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des cellules T et formation d'une particule virale
- Table 1 Classification taxonomique du VIH-1
- Table 2 Récapitulatif des fonctions et partenaires des protéines virales
- Table 3 Résolution spatiale en xy théorique en fonction du système optique utilisé
- Table 4 Séquences nucléiques et protéiques des constructions de Gag-(i)mEOS2 réalisées
- Table 5 Présentation des principales protéines Gag-(i)mEOS2 utilisées pour l'étude de leur dynamique à la membrane plasmique des cellules T
- Table 6 Récapitulatif des diamètres moyens des plateformes d'assemblage de chaque population
- Table 7 Récapitulatif des données obtenues par l'étude de la morphologie des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des Lymphocytes T
- Table 8 Récapitulatif des études de la morphologie des particules virales ou des plateformes d'assemblage intracellulaires de Gag

LISTE DES FIGURES

AVANT PROPOS

Mon travail de thèse a porté sur l'organisation spatio-temporelle de la protéine virale Gag, fusionnée au fluorophore mEOS2, au cours de l'assemblage du VIH-1 (*virus de l'immunodéficience humaine*) grâce à une technique de microscopie dynamique super-résolutive, le sptPALM (*single particle tracking Photoactivable Localization Microscopy*). Ce travail a pour objectif de comprendre comment les protéines Gag-(i)mEOS2 sont réparties à la membrane plasmique des Lymphocytes T CD4+ avec une résolution spatiale inférieure à la taille d'un virus, et comment cette organisation évolue au cours du temps lorsqu'une particule virale est en train de se former, à l'échelle de la protéine unique et avec une résolution temporelle inférieure à la seconde.

Ce manuscrit s'organise en trois parties majeures :

La première partie permet d'apporter les informations nécessaires à la compréhension des problématiques de mon sujet de thèse. Elle est donc divisée en deux chapitres : le premier chapitre porte sur le virus de l'immunodéficience humaine afin de présenter ses caractéristiques et son cycle de réplication, en mettant l'accent sur l'assemblage du virus dans les lymphocytes T. Le deuxième chapitre porte sur la nanoscopie dynamique, afin de présenter les connaissances de base en microscopie de fluorescence en insistant sur le principe de la technique de sptPALM, l'acquisition des images par cette technique et l'analyse des données obtenues. Cette première partie est suivie de la présentation de mes objectifs de thèse.

La deuxième partie de mon manuscrit présente les résultats obtenus au cours de ma thèse. Cette partie se divise en cinq chapitres. Le premier expose les outils biologiques que j'ai utilisés pour réaliser mon étude : ce chapitre présente la caractérisation fonctionnelle des protéines Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants que j'ai réalisés par mutagenèse. Le deuxième chapitre définit la stratégie d'analyse que nous avons adoptée pour étudier la dynamique d'assemblage de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des cellules T Jurkat.

Les trois chapitres suivant présentent les résultats obtenus par microscopie super-résolutive. Ils sont chacun organisés en trois sous-parties : les deux premières présentent les différents résultats de l'étude, et la dernière est une conclusion-discussion du travail présenté dans le chapitre concerné. Ce travail est présenté selon une approche dite "en entonnoir" :

- La première étape est d'étudier la morphologie des plateformes d'assemblage viral formées par Gag-(i)mEOS2 à la membrane des cellules T fixées par microscopie PALM (chapitre 3). Nous cherchons ici à connaître la répartition spatiale de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants à la membrane plasmique des cellules T. Les cellules ne sont pas vivantes.
- La deuxième étape est d'étudier la diffusion de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des cellules T vivantes (chapitre 4). Nous cherchons ici à déterminer la dynamique des protéines membranaires de Gag-(i)mEOS2 à l'échelle de la cellule.
- La dernière étape est d'étudier le processus de formation des plateformes d'assemblage dans le temps et l'espace (chapitre 5). Nous cherchons ici à comprendre l'évolution de la

dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 au cours de la formation d'une plateforme d'assemblage, à l'échelle d'un virion unique.

La dernière partie est une conclusion générale du projet de recherche, qui amène des éléments de discussion par rapport à ce qui est connu dans la littérature actuelle quant à la dynamique des protéines Gag en cellules vivantes. Cette partie est conclue par la proposition d'un modèle de la dynamique d'assemblage de Gag sous forme de schéma bilan.

Afin de préserver une certaine continuité dans la lecture de ce manuscrit, le matériel et méthodes est présenté après la discussion générale. Au sein de la partie présentant les résultats, cependant, chaque partie indique la page du matériel et méthode à laquelle il faut se référer si des informations complémentaires sont souhaitées.

A la fin du manuscrit, après les références bibliographiques, quatre annexes sont présentées: les trois publications scientifiques auxquelles j'ai participé sont intégrées, précisant ma contribution à chaque travaux, et enfin la liste des congrès internationaux où j'ai eu l'opportunité de présenter mes travaux de recherche.

INTRODUCTION

Image soumise aux droits d'auteur

Figure.1 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH dans le monde en 2014. L'Afrique sub-saharienne et l'Asie-Pacifique sont les régions les plus touchées par l'infection du VIH. - Source: Onusida - chiffres clé 2015

Famille	sous-famille	Genre	Espèce
Retrovirus	Orthoretrovirus	Alpharetrovirus	ALV <i>Avian leukosis virus</i>
			AMV <i>Avian myeloblastosis virus</i>
			FSV <i>Fujinami sarcoma virus</i>
			RSV <i>Rous sarcoma virus</i>
		Betaretrovirus	MPMV <i>Mason-Pfizer monkey virus</i>
			MMTV <i>Mouse mammary tumor virus</i>
			SMRV <i>Squirrel monkey retrovirus</i>
		Deltaretrovirus	BLV <i>Bovine leukemia virus</i>
		Epsilonretrovirus	PTLV-1/2/3 <i>Primate T-lymphotropic virus 1, 2 & 3</i>
			WDSV <i>Walleye dermal sarcoma virus</i>
	Gammaretrovirus	WEHV-1/2 <i>Walleye epidermal hyperplasia virus 1 & 2</i>	
		MLV <i>murine leukemia virus</i>	
		FLV <i>feline leukemia virus</i>	
		HMSV <i>Harvey murine sarcoma virus</i>	
	Lentivirus	KMSV <i>Kirsten murine sarcoma virus</i>	
		BIV <i>Bovine immunodeficiency virus</i>	
		FIV <i>Feline immunodeficiency virus</i>	
SIV <i>Simian immunodeficiency virus</i>			
HIV-1 Human immunodeficiency virus 1			
HIV-2 Human immunodeficiency virus 2			
PLV <i>Puma lentivirus</i>			
EIAV <i>Equine infectious anemia virus</i>			
VMV <i>Visna/maedi virus</i>			
CAEV <i>Caprine arthritis encephalitis virus</i>			
Spumaretrovirus	Spumavirus	BFV <i>Bovine foamy virus</i>	
		EFV <i>Equine foamy virus</i>	
		FFV <i>Feline foamy virus</i>	
		SFV <i>Simian foamy virus</i>	
		HFV <i>Human foamy virus</i>	

Taxonomie issue de la banque de données de l'International Committee on Taxonomy of viruses - database 2015

Tableau 1 : Classification taxonomique du VIH-1

Chapitre 1. Le Virus de l'Immunodéficience humaine de type 1

1. Le virus de l'immunodéficience humaine : origines et caractéristiques

1.1. Le SIDA : épidémiologie et prévalence

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), responsable de plus de 34 millions de décès en décembre 2015 selon l'OMS. Fin 2014, environ 36,9 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde, dont 2 millions de nouvelles infections [rapport OMS, décembre 2015]. Les seuls traitements possibles sont les médicaments antirétroviraux (Highly Active Antiretroviral therapies HAART) qui limitent la propagation du virus ainsi que sa transmission. Bien que ce traitement ait permis de baisser la propagation du virus de 35% entre 2000 et 2015 ainsi que le nombre de décès de 24% [rapport OMS 2015], il n'y a toujours pas de traitement pour guérir de cette infection. L'infection par le VIH reste donc un enjeu de santé public majeur.

Les personnes vivant avec le VIH se retrouvent dans le monde entier. Cependant, les continents les plus touchés restent l'Afrique et l'Asie/Pacifique, regroupant plus de 80% des personnes infectées dans le monde (figure 1).

1.2. Classification du VIH

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus (tableau 1). Les rétrovirus sont divisés en deux sous familles : les orthorétrovirus et les spumavirus. Les orthorétrovirus sont divisés en 6 genres, dont 5 sont des oncovirus, c'est à dire qu'ils induisent des tumeurs (type sarcome, carcinome, lymphome ou leucémie) suite à l'infection. Le seul genre non oncogène est celui des lentivirus, qui regroupe des virus cytopathogènes. Les rétrovirus possèdent des caractéristiques communes : ils ciblent les vertébrés et sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire qui possèdent une enzyme permettant la synthèse d'ADN à partir de leur ARN (la Reverse transcriptase) afin d'intégrer leur génome dans celui de l'hôte.

Le VIH appartient au genre des Lentivirus. C'est donc un virus cytopathogène qui infecte l'Homme, et cible majoritairement le système immunitaire de l'hôte.

1.3. Diversité génétique du VIH

La diversité génétique du VIH est complexe, dont l'origine vient de plusieurs transmissions inter-espèces de virus simiens à l'homme. On distingue deux groupes principaux : le VIH-1 et le VIH-2. Ce dernier est plus proche d'un point de vu phylogénétique du SIV (virus de l'immunodéficience simienne) et est retrouvé principalement en Afrique de l'ouest et Afrique centrale.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure.2: Arbre phylogénétique représentant les différents groupes du VIH/SIV.

Les groupes M, N et O dérivent du SIVcpzPtt (SIV from chimpanzee Pan troglodytes troglodytes) tandis que le groupe P dérive du SIVgor (SIV from gorilla). Le HIV-2 semble provenir du SIVsmm (Simian immunodeficiency virus from sooty mangabey monkeys) - Source: SidaScience - Inist - maj 14/02/2014

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 3.A : Sections représentatives par cryo-électrotomographie. Bourgeonnement d'une pseudo-particule virale (VLP) du VIH-1 (image de gauche), particule immature du VIH-1 (image centrale), et particule mature (image de droite). Source : Briggs et al., 2011

Image soumise aux droits d'auteur

Fig.3.B : Schéma de la structure d'un virion du VIH-1. (i) Virion immature. (ii) Virion mature. En violet sont représentées les glycoprotéines d'enveloppe, en jaune la bicouche lipidique issue de l'hôte, en marron la matrice M_{Ap}17, en vert la capsid C_{Ap}24, en bleu la nucléocapside N_{Cp}7, et en rouge l'ARN génomique. Source: Ganser-Pornillos et al., 2008

Le VIH-1 est constitué de 4 groupes : M, N, O et P, dont chacun possède des particularités génomiques, phylogénétiques et virales propres. Le groupe M est responsable de la pandémie de SIDA . En 2013, ce groupe M comptait 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et plus de 55 formes recombinantes circulantes (CRF) [Lau et al., 2013] (figure 2).

Dans notre étude, nous travaillons avec le VIH-1 de groupe M puisqu'il est responsable de 90% des infections au VIH dans le monde [Peeters et al., 2000 ; Mc Cutchan et al., 2000].

1.4. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1

1.4.1. Structure de la particule virale

Le VIH-1 est un virus sphérique d'un diamètre compris entre 100 et 130nm selon les études en microscopie électronique [Wilk et al., 2001 ; Briggs et al., 2011] (figure 3. A).

C'est un virus enveloppé dont la bicouche lipidique est issue de la membrane plasmique de la cellule hôte. Les glycoprotéines d'enveloppe (SUgp120 et TMgp41) sont associées en spicules insérés dans la membrane (figure 3.B). Lorsque le virus est mature, la membrane virale est soulignée par la protéine de matrice (MAp17). Au sein de la particule virale se trouve le core viral délimité par une coque conique constituée de protéines de capsid virale mature (CAp24). Il contient l'ARN génomique viral, composé de 2 simples brins d'ARN chaperonnés par les protéines de nucléocapsid (NCp7). On y trouve également les enzymes nécessaires à la réplication virale telles que la Protéase (PR), l'Intégrase (IN) et la Reverse Transcriptase (RT) ainsi que certains composés cellulaires qui ont été encapsidés dans la particule virale. Briggs et al. ont mis en évidence en 2003 qu'1/3 des particules produites présentent 2 cores viraux lors de l'observation de l'architecture des particules virales matures [Briggs et al., 2003].

La composition lipidique des particules virales, ou lipidome du VIH-1, est différente de la composition de la membrane plasmique. En effet, les virions sont enrichis en lipides saturés, et particulièrement en phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P2), phosphatidylsérine (PS), cholestérol et sphingomyeline (SM) quel que soit le type cellulaire producteur des virions [Brügger et al., 2006 ; Chan et al., 2008 ; Lorizate et al., 2013]. Il semblerait également que, même si la quantité de phospho-inositides total (PI) soit équivalente à celle de la cellule productrice, il y ait un enrichissement de PI-mono-insaturé [Lorizate et al., 2013]. Cette composition lipidique spécifique de la membrane virale, tant au niveau des types de lipides ou leur saturation, suggère une structure membranaire plus rigide que la membrane plasmique d'où la particule virale bourgeoine [Lorizate et al., 2013]. Cette spécificité est la conséquence du processus d'assemblage membranaire du virus dont nous parlerons plus largement dans la section suivante.

La stœchiométrie des protéines de structure virales, issues du clivage protéolytique du précurseur viral Gag par la protéase PR, au sein des particules virales apporte des informations majeures quant à la densité et l'espacement de Gag dans les particules immatures, et les

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 4: Cinétique d'infection du VIH. Evolution de la charge virale et de la concentration de Lymphocytes T CD4+ au cours de la maladie chez les patients non traités

réarrangements protéiques induits par la maturation virale. Une particule virale mature contient entre 1200 et 2500 protéines de CA matures. Cette valeur est une estimation issue de l'extrapolation du nombre de CA par virion, calculée à partir des ratios CA/ARNv ou via la concentration de CA par rapport au nombre total de particules virales [Cimarelli et al., 2002 ; Turner et al., 1999].

1.4.2. Le tropisme viral

Le tropisme viral est déterminé par l'expression du récepteur et du corécepteur qui sont nécessaires à l'entrée du virus par la cellule hôte. Ainsi, le VIH-1 cible les cellules porteuses du récepteur cellulaire CD4. Cependant, on distingue différents types de VIH selon le corécepteur utilisé pour infecter leur cible. Ainsi certains types de VIH-1 utilisent le corécepteur CCR5 (cellules dendritiques, macrophages, monocytes, cellules T) ou le corécepteur CXCR4 (ubiquitaire), bien qu'il existe certains types de VIH qui sont capables d'utiliser les 2 corécepteurs [Naif et al., 2013]. Le VIH-1 cible principalement les cellules de l'immunité. Les cellules T sont considérées comme les cibles majeures du VIH-1. Leur population totale diminue au cours de la pathologie, aboutissant à l'émergence de la phase SIDA (figure 4).

Les thérapies antirétrovirales peuvent juguler la charge virale des patients séropositifs au VIH, mais elles ne permettent pas de guérir l'infection. L'obstacle majeur à l'éradication du virus est dû à l'apparition de cellules cibles réservoirs, très tôt au cours de l'infection. Ces cellules contiennent le génome du virus mais celui-ci est transcriptionnellement inactif. La dynamique des cellules réservoirs est encore peu connue, et bien que plusieurs types cellulaires semblent impliqués, les cellules réservoirs sont principalement les cellules T quiescentes [Trono et al., 2010]. Ces cellules peuvent à tout moment ré-exprimer de nouvelles particules virales après leur activation. Il a également été reporté que, lors des phases tardives de l'infection, le VIH peut infecter d'autres types cellulaires que les cellules de l'immunité, tels que les cellules du système nerveux central [Joseph et al., 2015].

1.5. Le génome viral

Le génome viral est composé de 2 simples brins d'ARN d'~9kb à polarité positive. Il est rétro-transcrit en ADN double brin complémentaire de 9719 paires de bases lors des étapes précoces de la réplication virale (figure 5).

Le génome est composé de 3 gènes majeurs, codés à partir du 5'-LTR : *gag* (group-specific antigen), *pol* (polymerase) et *env* (enveloppe). Le gène *gag* code pour le précurseur protéique pr55Gag qui permettra l'expression des protéines de structure après clivage par la protéase virale PR. Ces protéines de structure sont la matrice (MAp17), la capsid (CAp24), la nucléocapside (NCp7) et la protéine p6. Le gène *pol* code pour les enzymes virales : la reverse transcriptase (RTp66/p51), l'intégrase (INp32) et la protéase (PRp10). Le gène *env* code pour le

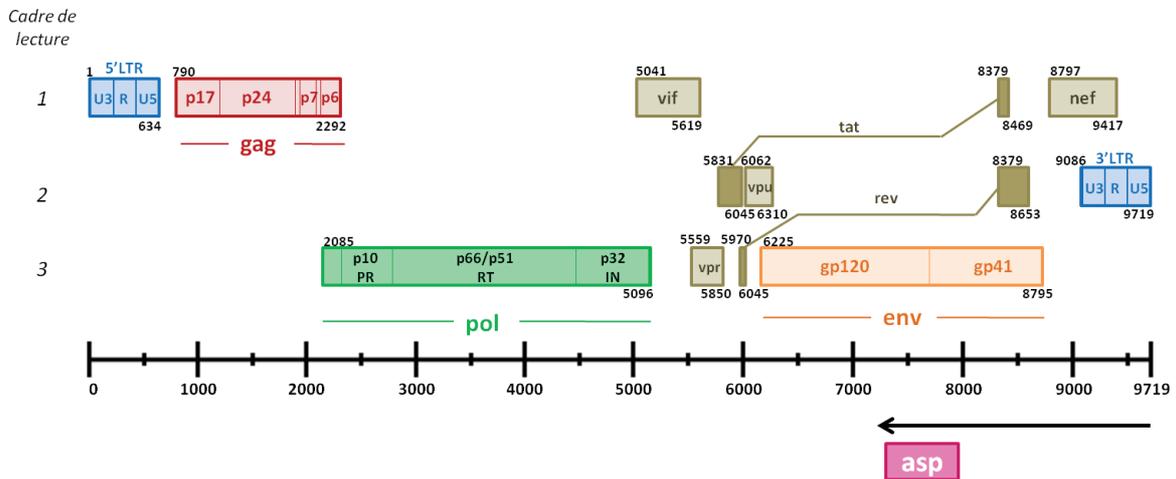


Figure 5. Organisation du génome du VIH-1 (adapté de Thomas Spletstoeser)



Figure 6 : Structure de l'extrémité 5' de l'ARNv du VIH-1. La région R contient le signal TAR, *trans-acting responsive element* et le signal de poly-adénylation (PolyA) ; PBS, *primer-binding site*; DIS, *dimerization initiation site*; SD, *major splice-donor site*. a. Représentation schématique de l'ARN génomique du VIH-1. b. Structure secondaire des 500 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARNv. Les éléments majeurs de la structure sont indiqués selon TAR, Poly-A, PBS, DIS, SD, Psi (signal d'encapsulation de l'ARN), AUG (codon d'initiation du gène gag). Les régions impliquées dans le complexe de dimérisation sont encadrés en jaune.

Source : Paillart et al., 2004

précurseur gp160 qui donnera lieu à l'expression des protéines d'enveloppe (Env) gp120 et gp41. Grâce à l'épissage alternatif, le génome du VIH-1 code également pour les protéines régulatrices Tat et Rev ainsi que les protéines accessoires Nef, Vif, Vpr et Vpr. Un autre gène a récemment été mis en évidence pour coder une protéine anti-sens, ASP (*antisens protein*), qui pourrait être exprimé à partir d'un transcrit antisens initié au 3'-LTR [Torresilla et al., 2013 ; Cassan et al., 2016]. Le provirus est encadré par 2 régions LTR (Long terminal repeat) identiques, comprenant chacune les sites U3, R et U5 nécessaires à la réverse transcription et à l'intégration de l'ADN viral complémentaire dans le génome de l'hôte.

L'ARN génomique (ARNv) du VIH-1 est composé de plusieurs structures secondaires conservées formant une série de structures tiges-boucles. Celles contenues à l'extrémité 5' sont connectées entre elles [Lu et al, 2011]. (figure 6). Ces structures déterminent des sites spécifiques, dont chacun a un rôle primordial dans les étapes de la réplication du VIH dans ses cellules hôtes [Watts et al., 2009] :

- rôle dans la reverse transcription du génome : le site de liaison au primer PBS (primer binding site) ; les régions cPPT et PPT [Watts et al., 2009]
- rôle dans la transcription du provirus : la région trans-activatrice TAR (trans-activation region), qui va permettre le recrutement de la protéine virale Tat, facteur d'élongation de la transcription [Dingwall et al., 1989 & 1990]; et enfin le signal de polyadénylation (poly(A)),
- l'export nucléaire : l'élément de réponse à la protéine Rev du VIH-1 au sein du gène *env*, appelé séquence RRE (Rev response element), permet le transport du génome transcrit du noyau vers le cytoplasme par la reconnaissance de la séquence RRE par la protéine virale Rev [Mann et al., 1994]
- rôle dans la traduction : la séquence IRES (Internal ribosome entry sequence) permettant le recrutement des ribosomes
- rôle dans la dimérisation de l'ARNv : le site d'initiation de la dimérisation de l'ARNv DIS (dimer initiation site) [Huthoff et al., 2001 ; Kenyon et al., 2011]
- rôle dans l'encapsidation du génome : séquence signal Ψ , nécessaire au recrutement de l'ARNv au site d'assemblage lors de la formation de nouveaux virus [Guzmann et al., 1998 ; Amarasinghe et al., 2000 ; Amarasinghe et al., 2001].

1.6. Les protéines de structure du VIH-1

Les protéines de structure sont issues du clivage d'un précurseur protéique : la polyprotéine pr55Gag, issue de la traduction cytosolique de l'ARNv non épissé. Cette protéine Gag est maturée par clivage protéique grâce à la protéase virale (PR) qui la coupe en plusieurs sites pour libérer les protéines virales matures.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 7 : Structure tertiaire de la protéine de matrice MAP17. (A) Représentation de la matrice myristoylée en conformation [myr(s)] avec le logiciel JSmol. La protéine est représentée avec les structures secondaires en style rubans couleur "rainbow", le myristate est représenté en style "boules et bâtons". (B) Représentation des trimères de MA vue de côté et du dessus.

Source : Bell et al., 2013

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 8 : Représentation schématique des interactions entre les protéines de capsid et de la structure fullerène de la capsid virale. A. Dimère de capsid - représentation des monomères en ruban et en tube des monomères (CTD en gris et NTD en vert). L'interface entre les CTD est représenté par un trait en pointillé. Echelle: 5nm. **B. Pentamère et hexamère de CA** (les NTDs sont distingués par des couleurs - tous les CTDs sont en gris). **C. Représentation de la capsid mature** selon la proposition de Pornillos et al, Nature 2011. Les NTDs hexamériques de CA sont en verts et les NTDs pentamériques de CA sont en rouge. (Source: Grime et al., 2016)

1.6.1. La matrice MAp17

La protéine de matrice MAp17 contient 128 acides aminés (17kDa) et forme une couche protéique associée au feuillet interne de la membrane virale. La structure issue de la cristallographie révèle que la protéine de matrice s'associe en trimères [Hill et al., 1996] (figure 7). Lorsque la MA interagit avec une membrane, elle forme des hexamères de trimères, notamment lorsque la membrane contient du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PI(4,5)P2 [Alfadhli et al., 2009]. La Glycine N-terminale (Gly-2) de la MA est myristoylée (ajout d'un acide gras saturé à 14 carbones : le myristate). Les études structurales par RMN révèlent que la protéine de matrice myristoylée (myr-MA) présente une conformation dont le myristate est exposé [myr(e)] ou séquestré [myr(s)]. Cependant, la structure tertiaire de la protéine est, dans les deux cas, très similaire [Tang et al., 2004]. En effet, lorsque le myristate est séquestré, il s'intègre dans une poche hydrophobe dont les ajustements conformationnels pour l'insertion du myristate sont mineurs [Tang et al., 2004]. Au sein de la particule virale, la MA est en conformation [myr(e)] et le myristate est ancré dans le feuillet interne de la membrane.

1.6.2. La capsid CAp24

La capsid CAp24 est une protéine de 230 acides aminés (24kDa) constitutive de la capsid conique du virus mature formant le core viral.

La capsid est divisée en deux domaines (figure 8) : le domaine N-terminal NTD (résidus 133-282) et le domaine C-terminal CTD (résidus 283-363), reliés entre eux par une charnière protéique flexible. La capsid s'associe en structures pentamériques et hexamériques, formées à partir des interactions entre les NTD. La capacité de la capsid à former ces deux types de structures est essentielle pour la production de la capsid virale mature selon son architecture fullerène caractéristique (figure 8.C) [Pornillos et al., 2011]. Par ailleurs, les protéines de CA forment des dimères via leurs CTD, et notamment via l'orientation parallèle de la deuxième hélice du CTD. Il existe également un domaine de 20 résidus, distinct de l'interface du dimère de CA, qui permet l'interconnexion des CTD entre eux grâce à un réseau de liaisons hydrogènes intriquées [Gamble et al., 1997]. Ce domaine, très conservé chez tous les rétrovirus est appelé région d'homologie majeure (MHR).

Considérant l'importance de la structure de la capsid virale dans l'infectivité et la propagation du virus, la maturation virale est une des cibles des traitements antirétroviraux [Urano et al., 2015]. Un des principes actifs est notamment d'inhiber la formation de l'interface moléculaire CA-CA dans les capsides matures [Ganser-Pornillos et al., 2008].

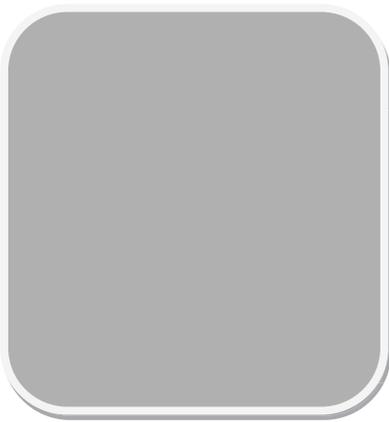


Figure 9 : Structure tertiaire de la nucléocapside NCp7 du VIH-1 liée à la boucle SL3 du signal ARN Ψ par RMN hétéronucléaire. En rose : boucle SL3 de l'ARN Ψ . En blanc : structures N- et C-terminale en doigt de Zinc de la NC avec l'ion Zn^{2+} en gris. En violet : structures secondaires de la NC. (Source: PDB entry 1A1T - DeGuzman et al., 1998.)

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 10: Schéma du cycle de répllication du VIH-1 (Source : expasy-viralzone 5096)

1.6.3. La nucléocapside NCp7

La nucléocapside NCp7 contient 55 acides aminés (7kDa) arrangés en deux motifs en doigt de zinc séparés par une région basique (figure 9). Cette protéine interagit avec l'ARNv via sa séquence signal psi Ψ et est responsable de l'encapsidation du génome viral dans la particule. Au sein de la particule virale, elle joue le rôle de chaperonne stabilisant l'ARNv au sein du core viral. La NC joue plusieurs rôles dans la réplication virale, notamment dans le recrutement du tRNA^{Lys3} lors de l'amorçage de la RT ou lors de l'assemblage viral, en tant que domaine de la polyprotéine Gag [Muriaux & Darlix, 2010]. Nous verrons ses différents rôles dans l'assemblage viral dans la partie suivante.

1.7. Le cycle répliatif du VIH-1

Le cycle répliatif correspond aux différentes étapes réalisées par une particule virale pour entrer dans une cellule hôte afin de l'utiliser pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Pour le VIH-1, ce cycle est communément divisé en 2 parties : les étapes précoces, consistant en l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme jusqu'à l'intégration du génome viral dans le matériel génétique de l'hôte ; et les étapes tardives, consistant en la synthèse des composants viraux et en leur assemblage en une nouvelle particule virale bourgeonnant dans le milieu extracellulaire (figure 10).

1.7.1. Les étapes précoces de la réplication

1.7.1.1. Entrée du virus dans les cellules TCD4+

L'entrée du virus est orchestrée par les glycoprotéines d'enveloppe. Elles se situent à la surface de la particule virale, formant des spicules ancrés dans la membrane virale via la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire TMgp41 (figure 11). Ces spicules sont composés de 2 sous-unités associées chacune en trimères : la partie extérieure du spicule correspond à un trimère de la glycoprotéine de surface (SUgp120) associée par des interactions non-covalentes au trimère de glycoprotéine transmembranaire (TMgp41).

L'attachement du VIH à la membrane des cellules cibles commence par des interactions non-spécifiques entre la protéine d'enveloppe gp120 et des molécules d'adhésion (type intégrine ou des molécules de surfaces chargées négativement telles que des protéoglycanes héparane sulfates) afin de restreindre le virus à proximité de son récepteur spécifique [Saphire et al., 2001 ; Arthos et al., 2008]. La gp120 interagit ensuite avec le récepteur CD4 menant à un changement de conformation de la gp120, libérant ainsi le site d'interaction avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4. Cette dernière interaction va permettre l'exposition du peptide de fusion de la gp41 qui va induire la fusion des membranes virales et cellulaires. L'équipe de Wirtz s'est intéressée aux forces d'interaction entre la gp120 et le récepteur CD4. Étonnement, bien que l'interaction initiale soit forte ($\sim 6k_B T$), elle est rapidement déstabilisée, avec un temps caractéristique moyen de 0.3

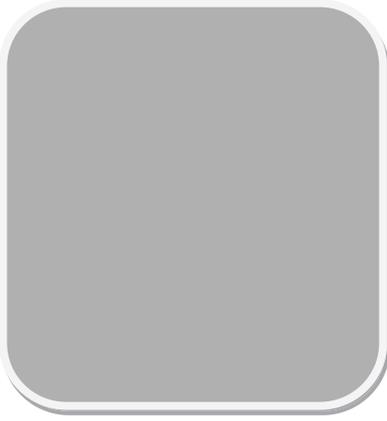


Figure 11: Structure des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1. La gp120 est représentée en jaune (structure issue de la diffraction aux rayons X de cristaux d'un trimer d'enveloppe du VIH-1 clivé), avec les sucres associés en orange. La gp41 est schématisée en rouge à travers la membrane représentée par un rectangle rose. *Source: PDB entry 4nco - pdb101 molecule of the month 169*

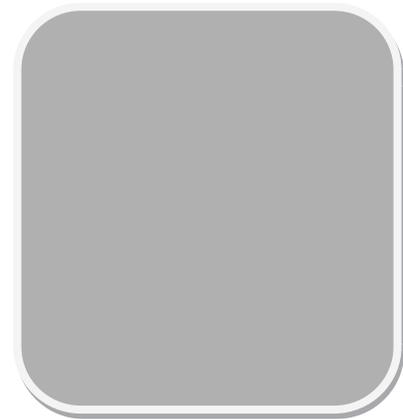


Figure 12 : Structure tertiaire de la reverse transcriptase du VIH-1 par diffraction aux rayons X. En rose : sous-unité p66 ; en bleu : sous-unité p51 ; en blanc : ADN ; boule grise : ion Ca^{2+} ; molécule en représentation boule et bâton : AZT. Résolution 3.3Å.

Source: PDB entry 5I42 - Das et al., 2016

secondes. L'interaction avec le corécepteur semble favoriser cette déstabilisation. Cette déstabilisation semble être due aux changements conformationnels qui s'opèrent lors de l'interaction enveloppe/CD4/CCR5, menant à une dissociation rapide du complexe [Dobrowsky et al., 2008]. Cette dissociation est en accord avec l'étude de Subramaniam sur la formation d'un pore de fusion au centre du complexe d'adhésion virus/cellule grâce auquel le core viral entre dans le cytoplasme cellulaire [Sougrat et al., 2007].

1.7.1.2. *Reverse transcription du génome et transport vers le noyau*

Arrivé dans le cytoplasme, le core viral est transporté vers le noyau. Au cours de cet acheminement, l'ARNv est rétro-transcrit en ADN double brin complémentaire grâce à la Reverse transcriptase virale RT. Cette protéine a une double activité enzymatique ADNpolymérase et RNaseH. C'est un hétérodimère asymétrique composé de 2 sous-unités : p66, composée de 560 acides aminés et p51, composée de 440 acides aminés (figure 12). La plus grande sous-unité de l'hétérodimère (p66) contient les sites actifs pour les deux activités enzymatiques de la RT (DNAPolymérase et RNaseH) grâce à 2 domaines distincts, tandis que la plus petite sous-unité p51, joue un rôle structural, stabilisant l'interaction acide nucléiques/p66 et facilitant ainsi l'activité enzymatique de la RT [Sarafianos et al. 2009].

Le VIH-1 utilise un tRNA-Lys3 cellulaire comme amorce de la synthèse d'ADN, appariée à l'ARNv au niveau de sa séquence complémentaire PBS (primer binding site) à l'extrémité 5' du génome. La synthèse de l'ADN viral (ADNv) s'initie avec la synthèse d'un brin d'ADN(-), complémentaire à l'ARNv, qui servira ensuite de matrice pour la synthèse du brin d'ADN(+) grâce aux régions cPPT et 3'-PPT servant d'amorces. La RT utilise son activité enzymatique RNaseH pour dégrader les brins hybrides ADN/ARN intermédiaires. On obtient alors un double brin d'ADN linéaire, complémentaire à la séquence d'ARN viral, avec les séquences LTR (U3-R-U5) identiques à chaque extrémité.

La séquence du VIH-1 varie considérablement, non seulement d'un patient à l'autre mais également au sein d'un même patient. Cette variabilité est due aux mutations insérées dans le génome au cours du cycle viral, induites par le fort taux de recombinaison et aux erreurs générées par la reverse transcriptase lors de la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN [Coffin et al., 1995]. Ce taux d'erreur est de 1 à 10 mutations par génome et par cycle [Coffin et al., 1995]. Cependant, certaines parties du génome sont plus conservées que d'autres: ainsi, l'enveloppe virale est la région la plus mutée tandis que les enzymes virales sont les plus conservées. Cette variabilité est le reflet de l'adaptation du virus à son environnement, afin d'échapper au système immunitaire de l'organisme hôte et étendre son tropisme.

La production d'ADN complémentaire va mener à la décapsidation et à la formation du complexe de reverse transcription (RTC : *reverse transcription complex*). L'ADNv est alors complexé avec l'Intégrase virale auquel s'ajoute plusieurs protéines cellulaires et virales dans un complexe nucléoprotéique appelé complexe de pré-intégration (ou PIC pour *pre-integration*

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 13.: A. Organisation des domaines de l'intégrase du VIH-1. NTD : domaine N-terminal ; CCD : domaine du cœur catalytique de l'IN (catalytique core domain) ; CTD : domaine C-terminal. **B.C&D Structure tertiaire des domaines d'un dimère d'IN du VIH-1.** (B) Structure par cristallographie du CCD [pdb entry 1ITG] - en rouge les résidus impliqués dans la triade catalytique DDE (le glutamate n'est pas visible sur la structure) et en bleu la substitution de la Lys185 permettant la solubilisation et la cristallisation du domaine de l'IN pour l'étude structurale. (C) Structure par cristallographie du NTD. (D) Structure par cristallographie du CTD.

Source: Engelman et al., 2014

complex). La composition exacte du PIC est controversée mais il semblerait qu'il contienne au moins les protéines virales IN, MA, RT, et Vpr, bien que certaines études mettent également en évidence la présence de CA, NC et PR [Gallary et al., 1995 ; Bukrinsky et al., 1993 ; Miller et al., 1997].

De nombreux facteurs cellulaires ont également été mis en évidence au sein de PIC pour permettre le transport de l'ADNv au noyau et l'intégration de ce dernier dans le génome de l'hôte [Farnet et al., 1997 ; Chen et al., 1998 ; Llano et al., 2004]. Cependant, le rôle fonctionnel de certains facteurs impliqués dans le PIC reste à déterminer. Ce complexe va être dirigé vers le noyau grâce aux microtubules du cytosquelette cellulaire [McDonald et al., 2002], et l'ADN va pouvoir entrer dans le noyau en passant à travers les pores nucléaires. Les composants formant le PIC sont primordiaux pour l'import nucléaire et l'insertion stable de l'ADNv dans le génome de la cellule hôte.

1.7.1.3. *Intégration dans le génome de l'hôte*

L'intégration de l'ADNv dans le génome de la cellule hôte ne se situe pas totalement au hasard, même si aucune stricte spécificité de séquence n'a pu être mise en évidence. L'équipe de D.J Munroe a montré que les séquences consensus palindromiques constituaient un élément favorable à l'intégration de l'ADNv [Xu et al., 2005]. De même, il semblerait que les régions de transcription actives sont également favorisées pour l'intégration virale [Schroder et al., 2002].

L'intégration du génome viral est réalisée grâce à l'Intégrase virale IN, une protéine de 288 acides aminés. Les études structurales montrent que l'IN est active lorsqu'elle est multimérique [Jones et al., 1992 ; Cherepanov et al., 2003]. Elle est composée de 3 domaines fonctionnels distincts (figure13): Le cœur catalytique (CCD) et les domaines N- et C-terminaux (NTD et CTD). Le CCD contient le site actif de l'activité enzymatique, il permet la catalyse du squelette phosphodiester de l'ADN de l'hôte nécessaire à l'intégration du génome viral. Les domaines NTD et CTD quant à eux, jouent un rôle dans la stabilité de l'interaction IN/ADN. Ces trois domaines ont une action coordonnée qui permet l'intégration covalente de l'ADNv synthétisé par la RT dans le génome de l'hôte.

Une fois l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire, on parle alors de provirus. Cette étape marque la fin des étapes précoces de la réplication virale

1.7.2. **Les étapes tardives de la réplication**

1.7.2.1. *Expression du génome viral*

Au cours du cycle viral, tous les gènes du VIH ne sont pas exprimés en même temps. En effet, les protéines Tat et Rev sont les premières protéines exprimées, tandis que le précurseur gp160 des protéines d'enveloppe, et les protéines accessoires Vif, Vpr et Vpu le sont plus tard dans les étapes d'infection. La transcription du provirus augmentant avec le temps, les dernières protéines à être synthétisées sont les précurseurs Gag et GagPol [Kim et al. 1989 ; Pomerantz et al. 1990]. Le contrôle de l'expression des gènes proviraux se situe au niveau transcriptionnel et

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 14: Schéma du profil d'épissage des ARNm transcrits à partir du provirus du VIH-1

post-transcriptionnel. Cette régulation des gènes est sous le contrôle des 2 protéines virales régulatrices Tat et Rev: Tat stimule l'élongation de la transcription tandis que Rev est nécessaire au transport des ARN messagers non épissés ou partiellement épissés du noyau vers le cytoplasme.

Le LTR fonctionne comme un promoteur, contenant tous les éléments nécessaires au recrutement des facteurs de transcription. Ce promoteur est sous le contrôle de la protéine virale Tat, agissant comme un trans-activateur de la transcription via son interaction avec la région TAR (transactivation-responsive region) [Dingwall et al., 1989 et 1990]. Le processus de trans-activation implique une cascade complexe de phosphorylations médiée par Tat et le facteur cellulaire P-TEFb qui régulent positivement ou négativement les facteurs d'élongation cellulaire. Ceci permet une transcription efficace du provirus en ARNm. Selon ce modèle, les conditions menant à une réduction du niveau d'expression de Tat pourraient être une cause de l'entrée en latence du provirus [Siliciano et al., 2011].

La transcription aboutit à trois types d'ARNm, classés selon leur degré d'épissage (figure. 14) [revue sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du VIH-1 : Karn et al., 2012]:

- les ARNm multi-épissés permettront l'expression des protéines Tat, Rev et Nef.
- les ARNm mono-épissés permettront notamment l'expression des protéines Vif et Vpr ainsi que l'expression du précurseur d'enveloppe gp160 et de la protéine accessoire Vpu grâce à un ARNm bicistronique vpu/env.
- l'ARNm non épissé donnera lieu à l'expression du précurseurs pr55Gag, mais également à l'expression du précurseur pr160GagPol via un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de l'ARNm non épissé.

Une fois transcrits, les ARNm doivent être exportés dans le cytoplasme. Les petits ARNm épissés ne nécessitent pas de transport particulier : ils utilisent les voies d'export nucléaire classiques [Karn et al., 2012]. En revanche, les cellules dégradent les ARNm non épissés ou partiellement épissés présent dans le noyau. Pour contrecarrer ce mécanisme cellulaire, le VIH-1 utilise sa protéine régulatrice Rev pour exporter ces ARNm vers le cytoplasme via la voie d'export cellulaire CRM1. Pour ce faire, Rev interagit avec la structure RRE (Rev-responsive element) des ARNm qui nécessitent un export actif [Malim et al. 1989]. Le RRE est une structure en tige-boucle de 351nt où la protéine Rev s'oligomérisse. Le degré d'oligomérisation de Rev est directement corrélé avec sa capacité à transporter l'ARNm [Mann et al., 1994], sachant que ce processus d'oligomérisation est coopératif. Ainsi, l'affinité Rev oligomérisé/ARNm est près de 500 fois supérieure à l'affinité Rev seul/ARNm [Daugherty et al., 2008].

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm vont être traduits par la machinerie cellulaire. Dans le cas de l'ARNm non épissé, sa traduction donne naissance à deux protéines : pr55Gag et pr160Gag-Pol. Ce dernier est dû à un décalage du cadre de lecture intervenant dans 5% des cas et aboutit à l'expression d'environ une molécule de Gag-Pol pour 20 molécules de Gag

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 15 : Synthèse et trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Source : Checkley et al., 2011

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 16 : Structure de la protéase PR mature du VIH-1. Les deux sous unités de la PR interagissent entre elles formant ainsi le cœur catalytique de l'enzyme (indiqué par une flèche). L'accès au site actif est modulé par deux structures hautement dynamiques composées de 4 brins β flexibles (représenté en rouge et indiqué par une flèche). Les extrémités N-terminale et C-terminale sont représentées en bleu et orange respectivement. Source : S. Kashif Sadiq et al. PNAS 2012

synthétisées [Jacks et al., 1988 ; Brierley et al., 2006]. Les ARNm sont traduits par la machinerie ribosomale dans le cytosol [Bolinger et al., 2009]. Cependant, l'ARNm codant pour les protéines d'enveloppe suit un processus particulier.

1.7.2.2. *La synthèse des protéines d'enveloppe*

Nous l'avons vu, les protéines d'enveloppe (Env) sont synthétisées à partir d'un précurseur protéique issu d'un ARNm mono-épissé bicistronique vpu/env. Cet ARNm est traduit en précurseur gp160 au sein du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (figure 15). Concomitant à la traduction, le précurseur gp160 est glycosylé au niveau de 81 sites de glycosylation. Les monomères de gp160 s'oligomérisent dans le RER principalement en trimères, même s'il est possible d'observer des dimères ou des tétramères [Earl et al., 1990]. Gp160 trafique au sein de la voie de sécrétion du complexe golgien où il est clivé par les protéases cellulaires. Les glycoprotéines matures de surface gp120 (SU) et transmembranaire gp41 (TM) restent associées par des liaisons non covalentes après leur clivage protéique. Suite à leur insertion dans la membrane plasmique, les protéines d'enveloppe sont rapidement recyclées par endocytose [Checkley et al., 2011]. L'internalisation des spicules d'enveloppe conduit à un niveau assez faible d'incorporation d'enveloppe dans les particules virales (~10 spicules/virus) [Zhu et al., 2003].

1.7.2.3. *L'assemblage et le bourgeonnement*

Notre problématique de recherche se situe au niveau de ces étapes d'assemblage de Gag à la membrane plasmique des cellules hôtes, et plus spécifiquement au niveau de la membrane des Lymphocytes T CD4+. Nous allons donc nous intéresser plus particulièrement à ces étapes dans la partie suivante. De manière générale, les composants viraux (Gag, GagPol, ARNv et Env) produits par le provirus vont s'assembler au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique [Hermida-Matsumoto et al., 2000 ; Jouvenet et al., 2006 ; Ono, 2009 et 2010]. Ces étapes sont orchestrées par la protéine virale Gag, qui va permettre le recrutement des composants viraux et cellulaires nécessaires à la formation d'une nouvelle particule virale [Gheysen et al., 1989 ; Campbell et al., 2001] qui sera relarguée dans le milieu extracellulaire grâce à un processus ESCRT-dépendant [Von Schwedler et al., 2003].

Cependant, si la formation d'un virion dépend seulement de Gag, les particules ainsi formées sont immatures et non infectieuses [Wagner et al., 1992]. Pour devenir infectieuse, les particules virales doivent subir un traitement protéolytique. Ce processus correspond à la maturation virale, orchestrée par la protéase PR du VIH-1. Cette enzyme permet le clivage des précurseurs pr55Gag et pr160GagPol. Son activité est conférée par sa dimérisation via les domaines N- et C-terminaux (figure 16). Son activité est primordiale dans le cycle répliatif du VIH-1 puisque la protéolyse de ces précurseurs induit un réarrangement important dans l'architecture du virus nécessaire à la formation d'une particule mature et infectieuse [Swanstrom & Wills, 1997].

La maturation s'initie durant le bourgeonnement et se termine après la libération de la particule

virale [Kaplan et al., 1994]. Il semblerait qu'il y ait un lien direct entre l'activité de la PR et la cytotoxicité cellulaire du VIH-1 pour les cellules infectées [Ventoso et al. 2005]. Certaines études montrent en effet que la PR du VIH-1 serait également capable de cliver des protéines cellulaires, et notamment des protéines du cytosquelette cellulaire, menant à la dégradation des cellules infectées [Shoeman et al., 1990, 1993, 2001 ; Konvalinka et al., 1995 ; Tomasselli et al., 1991].

1.8. Les protéines régulatrices et accessoires

Les protéines régulatrices (Tat et Rev) et des protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu et Nef) jouent un rôle dans la réplication virale et la persistance du virus dans son hôte. Nous l'avons vu, les protéines régulatrices Tat (Trans-Activator of Transcription) et Rev (Regulator of Virion protein expression) sont essentielles au bon déroulement de la réplication virale quel que soit le type cellulaire infecté. Les protéines accessoires, bien que non essentielles à la réplication virale *ex vivo*, ont pour objectif de contrer les barrières élaborées par l'hôte, appelées facteurs de restriction, afin d'assurer la persistance du virus au sein de l'hôte.

1.8.1. Nef

La protéine Nef (Negative Regulatory Factor) est une protéine myristoylée de 206 acides aminés. Elle est active une fois ancrée dans la membrane [revue sur la relation structure-fonction de Nef : Geyer et al., 2001]. Bien que non essentielle pour la réplication virale en culture de cellule, elle favorise la réplication virale et la pathogénèse du VIH dans les organismes hôtes. En effet, Nef permet au VIH d'échapper au système immunitaire. L'organisme a développé un mécanisme de reconnaissance des antigènes grâce aux Lymphocytes T cytotoxiques en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). Le facteur Nef protège les cellules primaires infectées des lymphocytes T cytotoxiques, en induisant l'endocytose et la dégradation du MHC-1 [Collins et al., 1998 ; Schwartz et al., 1996] via le recrutement de la protéine adaptatrice associée aux vésicules à clathrine 1 (AP-1) [Roeth et al., 2004]. Nef est capable d'interagir avec différentes protéines adaptatrices telles que AP-1, AP-2 et AP-3. Ainsi, en interagissant directement avec les protéines cellulaires d'une part et les différentes protéines AP d'autre part, Nef permet ainsi la diminution de l'expression de certaines protéines de l'hôte, telles que le MHC-1 ou le récepteur CD4 [Leonard et al., 2011]. La sous-expression membranaire du récepteur CD4 favorise la libération des virions produits par la cellule infectée en évitant des interactions Env-CD4 qui induiraient la rétention des virions à la surface des cellules [Ross et al., 1999].

Nef a également la capacité de moduler l'organisation du cytosquelette d'actine cortical via le recrutement de protéines kinases de type Src. Ceci induit une dérégulation du remodelage cellulaire via l'actine [Stolp et al, 2009] et induit également un défaut de mobilité cellulaire *in vivo* [Stolp et al, 2010] afin de favoriser la propagation du virus. Enfin, l'équipe d'O.T Fackler a également apporté des preuves selon lesquelles l'activité de Nef aurait la capacité de moduler la

composition lipidique des virions ainsi que celle des microdomaines membranaires [Brügger et al., 2007].

In vivo, Nef est un déterminant majeur de la pathogénicité du VIH-1 : elle est nécessaire pour maintenir une haute charge virale [Kestier et al., 1991]. Nef possède une fonction très conservée, connue pour améliorer l'infectivité des virions. Cette fonction est réalisée grâce à un domaine de Nef qui semble distinct de la régulation de l'expression des récepteurs CD4 [Goldsmith et al., 1995], bien que la manière dont Nef améliore l'infectivité des virions est encore peu comprise. Il semblerait que les virions produits en absence de Nef ne puissent pas réaliser une reverse-transcription efficace dans les cellules cibles [Aiken et al., 1995 ; Schwartz et al., 1995 ; Chowers et al., 1995]. Les équipes de H.G Göttlinger et M. Pizzato ont montré en 2015 que Nef favorise l'infectivité des virions du VIH-1 en inhibant l'incorporation des protéines SERINC5 et SERINC3 dans les virus [Usami et al., 2015 ; Rosa et al., 2015]. Selon ces travaux, Nef permettrait la diminution de l'expression membranaire de SERINC5 et SERINC3, ce qui préviendrait l'incorporation de ces protéines dans la particule virale. Les protéines de la famille des SERINC sont ubiquitaires chez les cellules eucaryotes, mais leurs fonctions restent peu connues. Certains travaux semblent montrer que les protéines SERINC permettent l'incorporation de Sérine au sein des Phosphatidylsérines et des sphingolipides. Usami et al. suggèrent ainsi que cette activité pourrait affecter la composition lipidique de l'enveloppe virale, et ainsi agir sur son pouvoir infectieux [Usami et al, 2015]. Cette conclusion fait écho à la conclusion de leurs homologues, l'équipe de M Pizzato, qui proposent un modèle selon lequel SERINC5 agirait sur les événements précoces de fusion membranaire lors de l'infection de la cellule cible par le VIH-1: la fusion des membranes virales et cellulaires mène à la formation d'un pore de fusion suivi de son expansion afin de permettre l'entrée de la capsidie dans le cytosol. Selon cette équipe, comme cet évènement est affecté par la composition lipidique des membranes, SERINC5 pourrait jouer un rôle lors de ces étapes précoces bien que le mécanisme reste à déterminer [Rosa et al., 2015].

Nef présente donc de nombreuses fonctions *in vivo*. C'est une protéine multi-fonctionnelle qui performe de nombreuses activités au sein des cellules afin de promouvoir la propagation du virus dans l'hôte et l'infectivité du virus.

1.8.2. Vif

La protéine accessoire Vif (Virion Infectivity Factor) est une protéine de 192 acides aminés hautement basique. Elle est essentielle à l'infectivité des particules virales infectieuses *in vivo*. Vif est un antagoniste des protéines APOBEC3G et APOBEC3F, des cytidine-désaminases cellulaires. En l'absence de Vif, APOBEC3 est encapsidée dans la particule virale grâce à son interaction avec l'ARNv [York et al., 2016]. Elle induit alors des dommages sévères au génome viral en désaminant les cytidines [Conticello et al., 2003 ; Sopak et al., 2003] menant à des défauts de rétro-transcription en interférant avec la RT [revue Holmes et al., 2007] et à des

mutations de G en A du génome viral [Browne et al., 2009]. En présence de Vif, APOBEC3G est exclue des virions, permettant une réplication efficace du virus. Vif dégraderait les protéine APOBEC3G via son interaction directe avec ces protéines et son association avec le complexe Cul5-E3 ubiquitine ligase, menant à sa dégradation protéosomale [Yu et al., 2003], et protégeant ainsi le VIH-1 de la dégradation cellulaire de son génome.

1.8.3. Vpu

La protéine virale U du VIH-1, ou Vpu (Viral protein U) est une protéine transmembranaire de 81 acides aminés exprimée assez tardivement dans le cycle infectieux du VIH-1. Le rôle principal de Vpu est de faciliter la libération des particules virales des cellules infectées. Elle module pour cela la distribution et/ou la concentration membranaire des protéines de la cellule hôte.

Vpu induit la dégradation du récepteur membranaire CD4. Comme Nef, Vpu agit comme un "connecteur" entre CD4 et les voies de dégradation cellulaire. Dans le cas de Vpu cependant, ce n'est pas les voies lysosomales qui sont utilisées, mais la dégradation protéosomale qui est utilisée pour la dégradation de CD4 [Schubert et al., 1998]. Vpu interagit avec la queue cytoplasmique de CD4 d'une part et avec la protéine h- β TrCP d'autre part [Margottin et al., 1998]. h- β TrCP contient un motif F-box (motif d'~50 acides aminés connu pour permettre les interactions protéines-protéines) et une répétition WD (Trp-Asp). La répétition WD de h- β TrCP interagit avec Vpu tandis que le motif F-box interagit avec la protéine Sk1p, une protéine connue pour recruter la machinerie de protéolyse ubiquitine-dépendante, induisant ainsi la dégradation protéosomale de CD4.

Vpu est également un antagoniste du facteur de restriction BST-2 (appelé également Tetherine). BST-2 empêche la libération de la particule virale néoformée en la maintenant reliée à la membrane plasmique. Vpu empêche l'activité antivirale de cette dernière en régulant négativement sa présence au site de bourgeonnement viral [Neil et al., 2008 ; Van Damme et al., 2008]. Il semblerait que Vpu augmente le taux de dégradation de BST-2 grâce au composant HRS du complexe ESCRT-0 qui induit une dégradation par les voies lysosomales [Janvier et al., 2011]. Le facteur cellulaire Rab7a jouerait pour cela un rôle de régulateur dans ce trafic endo-lysosomal, et participerait au processus de régulation permettant à Vpu de contrer la restriction BST2 [Caillet et al., 2011]. Une étude récente a également proposé un modèle selon lequel Vpu serait capable de créer un complexe avec BST2 et les protéines AP-1 en vue de la dégradation de ce facteur de restriction [Pujol et al., 2016].

1.8.4. Vpr

La protéine virale R, ou Vpr, est une protéine de 96 acides aminés qui est encapsidée dans les particules virales matures. Sa fonction dans le cycle de vie du VIH-1 a été longtemps débattue, notamment à cause de son effet cytopathique sur les cellules exprimant Vpr

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 17 : Précurseur pr55Gag : structure et fonctions de ses différents domaines.

A. Représentation linéaire des domaines de Gag: Matrice MA en bleu, Capside CA en vert, sp1 en vert clair, Nucléocapside NC en rouge, sp2 en bleu clair et p6 en orange. Le rôle de chaque domaine dans les étapes tardives de la réplication virale en dessous.

source Freed et al., 2015

B. Structure tertiaire de Gag. Matrice MA en rouge, Capside NTD en vert et CTD en bleu, sp1 en rose, et Nucléocapside NC en orange

source: Lingappa et al., 2014

[Muthumani et al., 2005 ; Sakai et al. 2006]. Cependant, il semblerait que la déplétion ou une mutation fonctionnelle de Vpr atténue la réplication virale *in vivo* [Gibbs et al., 1995].

Aujourd'hui, nous savons que Vpr est une protéine multifonctionnelle. Elle induit l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M, une phase où la transcription est plus active et serait donc en faveur de la réplication virale [Goh et al., 1998]. L'induction de l'arrêt du cycle en phase G2 est dépendante d'un motif SRIG très conservé chez Vpr [Maudet et al., 2011]. Vpr semble utiliser pour cela deux voies distinctes, nécessitant toutes les deux la liaison à la protéine DCAF1 [Maudet et al., 2011]. DCAF1 est une ubiquitine ligase, son recrutement par Vpr mènerait à la désactivation de deux facteurs cellulaires distincts nécessaires à la croissance cellulaire, bien que ces cibles de l'arrêt en G2 restent à déterminer [Maudet et al., 2011].

Vpr permet également de moduler l'état apoptotique des cellules T [Moon et al., 2006], régule l'activité du facteur nucléaire NF- κ B [Ayyavoo, et al. 1997], joue un rôle de coactivation transcriptionnelle des gènes viraux et cellulaire [Agostini et al., 1996], et participerait à l'import nucléaire du complexe de pré-intégration virale (PIC) [Jenkins et al., 1998], bien que cette fonction semble dépendre des conditions testées [Rivière et al., 2010].

Tous les éléments viraux, que ce soient les protéines structurales, enzymatiques, régulatrices ou accessoires, ont chacun un rôle qui a pour but d'assurer la propagation et la persistance du VIH dans l'hôte. La propagation virale est possible notamment grâce au processus aboutissant à la production de nouvelles particules virales infectieuses.

2. L'assemblage du VIH-1

2.1. Le précurseur protéique Gag

L'assemblage viral est un processus régulé par les composants viraux. Il est situé préférentiellement au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique [Hermida-Matsumoto et al., 2000 ; Jouvenet et al., 2006 ; Ono, 2009 et 2010]. La protéine virale Gag y joue un rôle majeur puisque son expression seule dans les cellules permet la formation de pseudo-particules virales (VLP) [Gheysen et al., 1989 ; Campbell et al., 2001].

Contrairement à la plupart des rétrovirus, le VIH-1 n'a pas besoin de ses protéines d'enveloppe de manière obligatoire pour bourgeonner. Seule, la protéine Gag peut réaliser toutes les étapes d'assemblage et de production virale, bien que les particules formées soient immatures et non infectieuses [Wagner et al., 1992].

La protéine Gag est une protéine de 499 acides aminés qui réalise les différentes étapes d'assemblage viral grâce à ses 4 domaines majeurs : le domaine matrice, MAp17 (17kDa – résidus 2-132), le domaine capsid CAp24 (24kDa – 133-363), le domaine nucléocapsid NCp7 (7kDa – 379-433) et enfin le domaine p6 (6kDa - 450-500) (figure 17). Les domaines CA et NC sont séparés par un peptide d'espacement appelé sp1 (résidus 364-378) et les domaines NC et

Image soumise aux droits d'auteur

Figure. 18: Phénotype des pseudo-particules virales produites par la protéine Gag WT et par la protéine Gag mutée au niveau du site de dimérisation de la capsid (mutations 316-WM/AA-317). Observation par microscopie électronique des particules virale formées par la protéine Gag *wild type* comparé à celles produites par la protéine Gag mutée au niveau des résidus WM de la CA. Echelle = 100nm

Source : Datta et al., 2007

p6 sont séparés par le peptide sp2 (434-449) [UniProtKB - O93182 Gag_HV190]. Ces domaines fonctionnent de concert pour coordonner le trafic et l'attachement de Gag à la membrane ainsi que les interactions structurales Gag-Gag afin de former une particule virale immature. Avant de pouvoir aborder le mécanisme de l'assemblage viral, nous allons tout d'abord présenter les caractéristiques majeures de chaque domaine de Gag.

2.1.1. Le domaine MA : domaine d'interactions aux membranes

Le domaine matrice, MAp17, est le domaine N-terminal de la protéine Gag. Elle joue trois rôles essentiels lors de l'assemblage viral : l'adressage de Gag à la membrane [Chukkapalli et al., 2008 ; Adhalfi et al., 2010], l'accrochage membranaire [Adhalfi et al., 2009], et l'incorporation des trimères de protéines d'enveloppe dans la particule virale en formation [Adhalfi et al., 2009].

Le domaine MA est composé de 131 acides aminés. Son extrémité N-terminale est myristoylée sur la Glycine située en 2^{ème} position. Elle contient également une région riche en résidus basiques, la région 26-KKKYKLLK-32, appelée la région HBR (*High Basic Region*). Ces deux régions ont un rôle majeur dans l'adressage spécifique de Gag à son site d'assemblage et dans l'interaction et la stabilisation de Gag à la membrane plasmique de la cellule hôte [Freed, 2015]. Le domaine MA permet également l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans la particule virale [Tedbury et al., 2015]. Nous préciserons ce dernier rôle dans la partie 2.6 de ce chapitre (cf. page 59).

2.1.2. Le domaine CA : domaine d'interaction Gag-Gag

Le domaine capsid est composé de 231 acides aminés. Sa structure est très similaire à celle de la capsid mature [Tang et al., 2002]. Il joue un rôle dans la multimérisation de Gag. En effet, la CA est connue pour s'auto-assembler *in vitro* [Rosé et al., 1992], avec une constante de dissociation d'un dimère de CA estimée avec un $K_d=10-20\mu\text{M}$ [Gamble et al., 1997 ; Del Alamo et al., 2003].

L'étude des sites impliqués dans cette multimérisation a mis en évidence deux acides aminés particuliers, situés dans la partie CTD de la capsid : les résidus 316-WM-317 (ou 184-WM-185 de la CA). Leur mutation en deux alanines permet de favoriser la fraction monomérique en solution à une plus grande concentration de Gag par rapport au WT (WT *wild type*). Cette mutation diminue par 100 la capacité de la protéine à multimériser *in vitro* tout en conservant la structure secondaire de la protéine [Datta et al., 2007]. *In cellulo*, l'expression du mutant Gag-WM induit également une diminution significative de production de pseudo-particules virales (VLP) par ces cellules, et l'observation en microscopie électronique des particules virales produites par ce mutant montre un phénotype irrégulier, tant en taille qu'au niveau de la forme, comparé au Gag WT (figure 18) [Datta et al., 2007 ; Von Schwedler et al., 2003]. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents mettant en exergue l'importance des interactions CA-CA pour induire la multimérisation de Gag dans le processus d'assemblage et ainsi la formation de

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 19 : Modèle du changement de conformation de sp1 durant l'assemblage. *Source : Datta et al., 2016*



Figure 20:

A. Structure secondaire du domaine NC de Gag montrant les deux motifs en doigts de Zn.

Source: Amarasinghe et al., 2001

B. Structure du signal d'encapsulation psi (Ψ) de l'ARN génomique du VIH-1. Le signal Ψ du VIH-1 est composé de quatre structures en tige-boucle (SL). Les sites de haute affinité de liaison sont en gris. Le codon d'initiation de Gag est indiqué en surbrillance grise. Le site donneur d'épissage (SD) est indiqué par une flèche.

Source : Darlix et al., 2013

particules virales [Accola et al., 2000 ; Johnson et al., 2002].

2.1.3. Le peptide d'espace sp1

La région sp1 de Gag est un petit peptide de 15 acides aminés permettant de faire le lien entre les domaines CA et NC. D'un point de vue structural, il a été montré que les 8 derniers résidus de CA ainsi que les 10 premiers résidus de sp1 formaient une hélice α , dont la composition suggère une hélice amphipatique, en solution aqueuse et à haute concentration protéique [Datta et al., 2011 ; Gross et al., 2000]. Ainsi, lorsque Gag s'accumule et que sa concentration atteint un certain seuil, la jonction CA-sp1 se replierait en hélice. Ce changement de conformation de sp1 se propagerait au sein du domaine CA, induisant l'exposition de nouvelles interfaces qui augmenteraient les forces d'interaction CA-CA, facilitant ainsi l'oligomérisation de Gag afin d'assurer un assemblage efficace (figure 19) [Guo et al., 2005 ; Datta et al., 2016].

La protéolyse de la jonction CA-sp1 est l'étape finale de la maturation virale. Cette étape est primordiale car il semblerait qu'une digestion partielle de cette jonction a un effet dominant-négatif sur l'infectivité virale [Müller et al., 2009 ; Checkley et al., 2010]. sp1 stabilise donc la structure de Gag et son clivage est nécessaire aux réarrangement conformationnels inhérents à la maturation virale.

2.1.4. Le domaine NC

Le domaine nucléocapside est composé de 55 acides aminés et présente une structure coiled coil avec 2 doigts de Zinc (ZF1, résidus 391-408 et ZF2, résidus 412-429), permettant de recruter l'ARNv et ainsi l'encapsidation de ce dernier dans les particules virales (figure 20.A). Le domaine NC reconnaît avec une grande spécificité la séquence signal psi Ψ de l'ARNv (figure 20.B) [Kutluay et al., 2014]. Cette séquence contient 120 nucléotides contenant quatre structures en tige-boucle (SL1-SL4). Cette interaction NC/ARN- Ψ est connue pour avoir un rôle important dans la régulation des étapes tardives de la réplication virale. Cependant, la protéine Gag reconnaît également d'autres sites de l'ARNv, tels que la séquence RRE, des séquences au niveau du codon start de Nef, et les séquences non traduites au sein de la région U3. D'autres sites du génome viral sont aussi liés à la protéine Gag, mais à des fréquences plus faibles [Kutluay et al., 2014].

L'équipe du Pr. Mike Summers a déterminé la structure de la nucléocapside NC liée à la troisième boucle SL3 du signal Ψ par RMN [Guzmann et al., 1998]. Cependant, ils ont démontré en 2000 et 2001 que la NC interagissait plus particulièrement avec les boucles SL2 et SL3 avec une haute affinité (dont les constantes sont proches : $K_d^{NC-SL2}=110(\pm 50)nM$ vs $K_d^{NC-SL3}=170(\pm 65)nM$) [Amarasinghe et al., 2000]. L'interaction NC-SL4 est plus faible, avec un ordre de magnitude près de deux fois plus faible que les interactions NC-SL2 et NC-SL3 [Amarasinghe

et al., 2001]. M. Summers propose donc le modèle selon lequel la boucle SL4 servirait à stabiliser la structure tertiaire de la séquence psi et ainsi assurer l'interaction NC-ARNv. L'interaction Gag-ARNv permet l'encapsidation de l'ARNv dans la particule virale. Mais cette interaction est également primordiale pour la multimérisation de Gag, sa localisation cellulaire et son accrochage membranaire [Bowzard et al., 1998 ; Burniston et al., 1999 ; Grigorov et al., 2007 ; Hogue et al., 2009]. L'ARN est donc un élément structural essentiel dans l'assemblage. En effet, la NC est également capable d'interagir avec les ARN cellulaires en absence de son ARNv [Muriaux et al., 2001 ; Rulli et al., 2007]. Ainsi, la formation des particules virales repose sur au moins deux principes fondamentaux : les interactions protéines-protéines mais également les interactions protéine-ARN.

2.1.5. Le peptide d'espaceur sp2

Le peptide sp2 de Gag permet de faire le lien entre les domaines NC et p6. Cependant, alors que le rôle du peptide sp1 dans l'assemblage de la particule immature et la régulation de la formation de CA mature a été largement décrit, le rôle de sp2 reste encore mal défini. En effet, la délétion de sp2 n'a pas d'effet apparent sur la morphogénèse virale, et ne conduit qu'à une réduction mineure de l'infectivité des particules virales produites [De Marco et al., 2012]. De plus, le clivage protéolytique entre NC-sp2 semble également superflu pour la maturation et l'infectivité virale [Coren et al., 2007]. Cependant, l'inhibition du clivage entre NC et p6, et dans une moindre mesure entre sp2-p6, induit une malformation du core viral dans près de 80% des particules formées, bien que la maturation de la CA elle-même semble intacte [De Marco et al., 2012]. Ainsi, il semblerait que, si la région sp2 n'a pas de rôle défini à ce jour, le clivage NC/p6 est essentiel pour la maturation virale et son infectivité [De Marco et al., 2012].

2.1.6. Le domaine p6

Le domaine C-terminal de la protéine Gag est un domaine de 52 acides aminés. Initialement considéré comme n'ayant pas de structure définie en solution [Stys et al., 1993], il semblerait que le domaine p6 présente des changements de conformations lorsqu'il interagit avec ses partenaires viraux et cellulaires. En effet, l'équipe d'U. Schubert a pu mettre en évidence deux structures de type hélice par spectroscopie RMN et dichroïsme circulaire dans des conditions mimant les interactions protéiques [Fossen et al., 2005]. Ce domaine subit de nombreuses modifications post-traductionnelles : en effet, p6 est sumoylée et phosphorylée, et elle contient un site d'ubiquitination [Ott et al., 1998 ; Muller et al., 2002 ; Gottwein et al. 2005 ; Curer et al., 2005 ; Radestock et al., 2013 ; Ott et al., 2000].

Le domaine p6 est connu pour réguler la scission membranaire des virions néo-formés de la surface des cellules grâce au recrutement des complexes cellulaires ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) [Von Schwedler et al., 2003].

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 21 : Phénotype des bourgeons viraux formés lors de l'induction de l'arrêt du bourgeonnement viral induit par la mutation de p6 et l'expression de dominants négatifs des protéines des complexes ESCRT. VIH Δ PTAP est un mutant du site de p6 recrutant les complexes ESCRT. CHMP et VPS sont des protéines appartenant au complexe ESCRT. **A.** VIH seul. **B.** VIH Δ PTAP. **C et D.** VIH + dominant négatif des protéines CHMP4B (DsRed-CHMP4B). **E.** dominant négatif des protéines CHMP2A (DsRed-CHMP2A). **F-P.** dominant négatif des protéines VPS4B (DsRed-VPS4B-E235Q). Echelle traits épais = 1 μ m / Echelle traits fins = 100nm. Les flèches blanches indiquent les virions donc le bourgeonnement a été arrêté à la membrane plasmique (absence de scission membranaire). Les têtes de flèches indiquent les couches de protéines qui s'accumulent à la membrane plasmique ou les membranes endosomales. Les flèches noires indiquent les striations qui apparaissent au niveau du cou du bourgeon viral bloqué à la membrane. n=noyau ; e=compartiment vacuolaire de classe E

Source: Von Schwedler et al., 2003

Ce recrutement des ESCRT est possible grâce à 2 domaines tardifs de p6 :

- Le domaine PTAP, situé à l'extrémité N-terminale de p6 : il interagit directement avec la protéine Tsg101 (*Tumor susceptibility gene 101*), qui appartient au complexe ESCRT-I. C'est le domaine majeur pour le recrutement des ESCRT
- Le domaine YPxL : permet le recrutement de la protéine ALIX (*ALG2-interacting protein X*), protéine des complexes ESCRT-I et ESCRT-III. Ce domaine tardif, bien qu'il ne soit pas le facteur dominant de la scission membranaire, est également requis pour une libération efficace du bourgeon viral.

Le domaine p6 permet ainsi la libération des particules virales dans le milieu extra-cellulaire [Huang et al., 1995 ; Gottlinger et al., 1991]. Les complexes ESCRT utilisent fréquemment l'ubiquitinylation des protéines comme signal de recrutement. L'ajout d'une ubiquitine après la traduction de p6 pourrait donc avoir un rôle dans le recrutement des ESCRT, bien que ceci n'ait pas encore été formellement confirmé [Sette et al., 2013]. La mutation de p6 ou l'expression de dominants négatifs des protéines des complexes ESCRT induisent l'accumulation de bourgeons viraux à la membrane, jamais relargués dans le milieu extracellulaire (figure 21) [Von Schwedler et al., 2003].

Par ailleurs, la mutation de la Ser-40 en Phe est capable de retarder l'étape finale de maturation virale et augmente l'association membranaire de Gag, bien que cette mutation ne cause aucune anomalie dans le relargage viral [Radestock et al., 2013 ; Votteler et al., 2011]. L'augmentation de l'association membranaire de Gag dans le cas de ce mutant augmenterait en revanche l'entrée de Gag dans le système ubiquitine/protéasome (UPS), aboutissant à une augmentation de la présentation de Gag au MHC-I [Hahn et al., 2011 & 2014].

L'alignement des séquences de Gag p6 du groupe M du VIH-1 a mis en évidence sept résidus glutamate très conservés. La mutation de ces résidus en Alanine a également mené à l'altération du clivage de Gag et à la diminution de production virale [Friedrich et al., 2016]. L'augmentation de l'association membranaire de Gag ainsi induite est également accompagnée par sa poly-ubiquitinylation et son entrée dans la voie de présentation antigénique au MHC-I [Friedrich et al., 2016].

Le domaine p6 contient un motif hautement conservé, LXXLF, qui permet le recrutement de la protéine virale Vpr [Salgado et al., 2009]. Vpr interagit directement avec ce motif de p6, ce qui permet son intégration dans la particule virale, et ainsi la régulation positive de l'infection des cellules. La phosphorylation de p6 permettrait l'incorporation de Vpr dans les virions en favorisant leur interaction [Kudoh et al., 2013].

Le domaine tardif de Gag joue un rôle primordial dans la libération de la particule virale et semble également stabiliser le clivage de Gag par la PR. Cependant, son rôle en tant que protéine maturée, au sein de la particule virale, n'a pas encore été déterminé.

2.2. La localisation cellulaire de Gag

2.2.1. Les facteurs influençant la localisation cellulaire de Gag

Dans les lymphocytes T, le feuillet interne de la membrane plasmique est le site majeur d'assemblage du VIH-1 [Hermida-Matsumoto et al., 2000 ; Jouvenet et al., 2006 ; Ono, 2009 et 2010]. La protéine Gag, synthétisée dans le cytosol, doit donc être adressée vers son site d'assemblage et cette interaction doit être stabilisée. Ce processus est régulé par différents facteurs [Freed EO, 2015].

- **Les interactions du domaine HBR de la MA avec le PI(4,5)P2:**

La MA joue un rôle important dans le processus d'assemblage. En effet, lorsque la matrice est mutée au niveau de sa région basique HBR, la protéine Gag ne cible plus la membrane plasmique, mais est retrouvée soit diffuse dans le cytosol soit dans les endosomes tardifs et les corps multi-vésiculaires (MVBs) [Ono et al., 2004]. Le même phénotype est retrouvé lors de la déplétion de PI(4,5)P2 dans les cellules grâce à la surexpression de phosphoinositide-5-phosphatase VI (5ptaseVI) [Chukkapalli et al., 2008]. Il avait déjà été montré que le PI(4,5)P2 jouait un rôle majeur dans la localisation cellulaire de Gag [Ono et al., 2004]. Les études structurales ont montré qu'il existait une interaction directe entre la région hautement basique HBR de la MA et la tête chargée négativement du PI(4,5)P2 [Saad et al., 2006 ; Shkriabai et al., 2006]. Cette interaction est spécifique : l'analyse de l'interaction de la MA à des liposomes de différentes compositions a montré que la MA interagissait d'autant plus avec les liposomes contenant du PI(4,5)P2 de manière dose-dépendante qu'avec les liposomes contenant le même nombre de charges ou qu'avec d'autres phosphoinositides. La spécificité d'interaction MA/PI(4,5)P2, comparée à d'autres lipides acides est donc forte [Chukkapalli et al., 2008 ; Alfadhli et al., 2010].

Pourtant, l'équipe de H.G Göttlinger a montré que la production de particules virales était près de 4 fois plus efficace en absence de la majorité de la MA (mutant MA Δ 8-126) par rapport au Gag WT. De même, ils ont montré que l'expression d'une protéine Gag dont la totalité de la MA a été remplacée par une ancre myristyl homologue était également capable de se répliquer efficacement [Reil et al., 1998]. Cette étude tend à montrer que la MA n'est pas indispensable à une réplication efficace, si ce n'est par la présence d'une ancre lipidique pour permettre l'accrochage membranaire. L'équipe d'A.Ono a pu expliquer ce phénomène en mettant en évidence la régulation négative de l'interaction MA/membrane par deux résidus Lysine (25-KK-26) de la MA. Leur mutation en Thréonine (25-KK/TT-26) induit des interactions PI(4,5)P2-indépendantes avec les membranes cellulaires. Leur conclusion est donc que ces résidus lysine évitent un accrochage non spécifique de Gag aux membranes cellulaires [Chukkapalli et al., 2010].

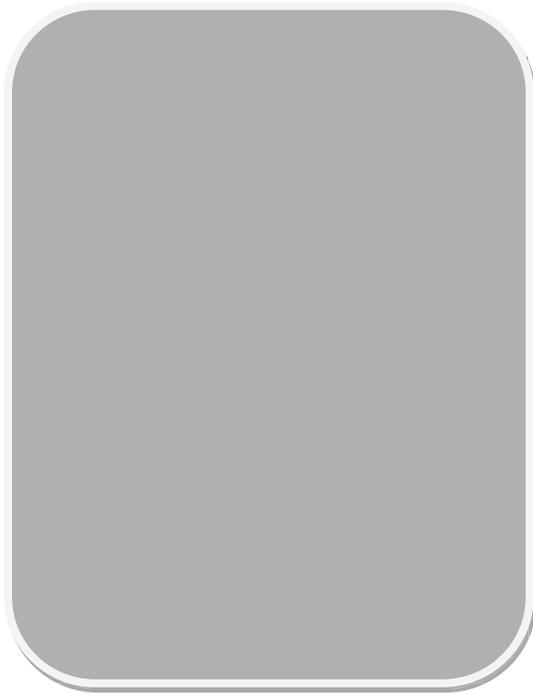


Figure 22 : Modèle de régulation de l'interaction de Gag aux membranes via l'ARN

Chukkapalli et al. 2010

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 23 : Modèle du changement d'interactions entre Gag et les ARNs durant la genèse virale.

La protéine Gag est représentée avec la MA en rouge, la CA en vert, la NC en bleu et p6 en gris. La membrane plasmique est schématisée grâce à deux arcs de cercle bleus. Les interactions avec les différents types d'ARN sont représentées : la MA de Gag interagit avec les ARNs cellulaires afin de permettre une interaction spécifique avec la membrane plasmique (cf section 2.2.1 - page 39). La NC interagit avec des ARNs cellulaires riches en Guanine (G) et Uracile (U) lorsque la protéine Gag est cytosolique. Dès que la protéine Gag multimérisse le long du feuillet interne de la membrane plasmique, le domaine NC semble interagir avec des ARNs enrichis en Adénine. *Source: Kutluay et al., 2014*

- **Les interactions Gag/ARN**

Il a été rapporté que le domaine matrice MA pouvait interagir avec des acides nucléiques via sa région basique HBR [Purohit et al., 2001 ; Jewell et al., 2005 ; Ott et al., 2005, Adhafi et al., 2011]. Ces ARNs, issus de la cellule hôte, semblent être principalement des petits ARNs de transfert (ARNt) [Kutluay et al., 2014]. L'ARN et les lipides acides seraient donc en compétition pour interagir avec la région HBR de la MA, et induiraient une régulation négative de l'attachement membranaire de Gag. Cette observation est confirmée par l'interaction qui a été mise en évidence entre la MA et les liposomes composés de lipides acides tels que la phosphatidylsérine (PS) qui intervient lors d'un traitement à la RNase, mais qui devient négligeable en présence d'ARN [Chukkapalli et al., 2010]. Cependant, l'affinité de la MA pour le PI(4,5)P2 est plus forte que pour les acides nucléiques [Alfadhli et al., 2009]. La conclusion de ces deux études est que l'interaction MA/ARN prévient une interaction précoce et non spécifique de Gag aux membranes cellulaires [Freed, 2015]. Ainsi, grâce à l'affinité forte de MA/PI(4,5)P2, Gag interagit avec la membrane uniquement lorsque celle-ci est enrichie en PI(4,5)P2 (figure 22). Autrement dit, ces régulations négatives via l'interaction MA/ARN et les Lysine de la MA permettent la spécificité d'interaction avec le feuillet interne de la membrane plasmique et prévient l'interaction avec les membranes des organites enveloppés de la cellule.

L'équipe du Dr. Paul Bieniasz a montré en 2014 que les interactions Gag/ARNs cellulaires via le domaine NC jouaient un rôle dans la localisation cellulaire de Gag : selon leurs travaux, il semblerait que les ARNs cellulaires recrutés par la NC soient différents selon que la protéine est cytosolique ou multimérisée le long du feuillet interne de la membrane plasmique. Ainsi, le domaine NC de la protéine Gag cytosolique interagirait majoritairement avec des ARN messagers (ARNm) riches en Guanine (G) et Uracile (U), tandis que les protéines Gag multimérisées le long du feuillet interne de la membrane plasmique interagiraient principalement avec des ARNm riches en Adénine (A) [Kutluay et al., 2014] (figure 23).

- **L'ancrage membranaire du myristate**

Il a été proposé que l'interaction directe entre le PI(4,5)P2 et le HBR de la MA induirait l'exposition du myristate N-terminal de la MA [Saad et al., 2006]. Le myristate exposé va s'ancrer dans le feuillet interne de la membrane plasmique et augmenter l'affinité d'interaction Gag/membrane [Saad et al., 2006]. Comme nous l'avons précisé précédemment, le myristate présente 2 conformations: une conformation où le myristate N-terminal est séquestré dans la poche hydrophobe de la matrice [myr(s)], et une conformation où le myristate est exposé [myr(e)]. L'exposition du myristate est modulée par différents facteurs : l'interaction de la MA avec une membrane contenant du PI(4,5)P2 [Saad et al., 2006], le pH [Fledderman et al., 2010], et la concentration en protéine ou la présence des domaines de multimérisation [Tang et al., 2004]. C'est la raison pour laquelle l'équipe de M. Summers a proposé un modèle selon lequel l'exposition du myristate était induite par une modulation entropique [Tang et al., 2004].

Autrement dit, l'auto-association de Gag conduit à une augmentation de l'organisation moléculaire qui favorise la conformation [myr(e)], et augmente ainsi la stabilité d'interaction Gag/membrane. Selon ce modèle, la multimérisation de Gag serait donc un facteur d'accrochage membranaire.

Notre équipe, en collaboration avec l'équipe de N. Floquet (IBMM, Montpellier) a utilisé la simulation numérique pour comprendre les étapes précoces d'interaction membranaire de la MA du VIH-1. Cette étude structurale suggère grâce à la modélisation moléculaire que l'interaction MA/membrane intervient en premier lieu grâce à des interactions électrostatiques ne faisant pas intervenir le site HBR. Le myristate exposé s'insère dans le feuillet membranaire : cette insertion semble énergiquement favorable, et suggère que le retour du myristate dans la poche hydrophobe de la MA est peu probable une fois intégré. L'ancrage du myristate induit alors un positionnement de la région HBR favorable à son interaction avec le PI(4,5)P2 [Charlier et al., 2014]. Selon ce modèle, l'ancrage du myristate intervient avant l'interaction HBR/PI(4,5)P2.

Ainsi, même si la séquence des événements reste encore débattue, il semble que les interactions HBR/PI(4,5)P2 et myristate/membrane sont primordiales pour l'ancrage stable de Gag au sein du feuillet interne de la membrane plasmique.

- **La multimérisation de Gag**

La multimérisation membranaire de Gag a un impact important sur l'assemblage viral. Les observations *in vitro* ont montré par exemple que la MA seule, bien que possédant le myristate et la région HBR, avait une affinité moins forte que Gag pour les membranes [Bouamr et al., 2003 ; Ono et al., 1999]. Lorsque la MA est monomérique, le myristate est préférentiellement séquestré dans la poche hydrophobe mais la trimérisation de la MA déplace cet équilibre [myr-(s)]/[myr-(e)] vers la conformation exposée [Tang et al., 2004]. De plus, l'affinité à la membrane de la MA seule augmente d'un ordre de magnitude lorsque la matrice subit une multimérisation artificielle [Dalton et al., 2007]. Ainsi la multimérisation de Gag semble favoriser l'interaction de Gag à la membrane et agir de ce fait sur sa localisation cellulaire.

Cette localisation est régulée à plusieurs niveaux :

- Au niveau des domaines de multimérisation : les mutations ponctuelles de la NC de Gag (délétion des doigts de zinc ou remplacement de ces doigts de zinc, mutation de la région basique située entre les doigts de zinc par des acides aminés neutres) impactent la localisation cellulaire de Gag en induisant une redistribution de Gag dans des compartiments intracellulaires de type endosomaux [Cimarelli et al., 2000 ; Ono et al., 2004 ; Grigorov et al., 2007].
- Au niveau de la CA : La mutation de la région d'homologie majeure (MHR) de la CA induit un arrêt de l'assemblage au niveau de la membrane plasmique, et un défaut de production virale [Von Schwedler, 2003]. Il semblerait cependant que cette mutation induise un arrêt de l'assemblage au niveau de la membrane sous forme de multimères intermédiaires de Gag,

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 24 : Schéma de l'arrangement moléculaire de Gag en interaction avec la membrane au sein d'une particule assemblée immature. La matrice (en rouge) est associée en trimères, la capsid (NTD en vert et CTD en bleu) est représentée selon sa configuration hexamérique. La NC (orange) est associée à l'ARNv (en noir)

Source : Lingappa et al., 2014

complexés avec l'ARNv et des protéines cellulaires [Tanaka et al., 2016]. Selon les auteurs, leurs données suggèrent l'existence d'un processus énergie-dépendant pour finir l'assemblage viral et aboutir à une particule virale. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Lingappa et al., qui ont montré que le système minimum pour réaliser un assemblage complet de CA en système *in vitro* nécessitait l'action d'une ATPase et de substrats énergétiques. Sans l'apport exogène de ces composants, l'assemblage de Gag se limite à des multimères de Gag de taille intermédiaire sans jamais atteindre sa morphologie finale [Linggappa et al., 2009].

- Au niveau de l'ARNv : On observe également un défaut de localisation cellulaire, associé à un défaut d'export de l'ARNv du noyau vers le cytoplasme [Jin et al., 2009]. L'ARN étant un facteur essentiel de multimérisation, cela confirme les résultats obtenus précédemment.

La multimérisation joue donc un rôle majeur dans le maintien de Gag à son site d'assemblage via la dimérisation des domaines CA, et le recrutement de l'ARNv, utilisé comme support de multimérisation de Gag, par le domaine NC [Ott et al., 2009 ; Kutluay et al., 2010]. Gag présente des éléments fonctionnellement redondants en ce qui concerne l'assemblage viral : la myristoylation N-terminale de Gag, l'interface de dimérisation de la CA, et l'interaction ARN/NC [O Carroll et al., 2012]. En effet, l'équipe d'A. Rein a montré que l'ablation d'un seul de ces éléments permet, au moins partiellement, l'assemblage de Gag dans les cellules humaines en des particules sphériques dont le rayon de courbure est similaire aux particules de Gag sauvage, bien que de morphologie plus grossières. Cependant, les protéines Gag dont deux ou la totalité de ces éléments sont altérés sont incapables de s'assembler, et aucune courbure régulière de la membrane n'apparaît.

Aujourd'hui, le modèle généralement accepté pour l'assemblage du VIH-1 propose donc que l'ARNv agit comme plateforme sur laquelle les molécules de Gag se lient via leur domaine NC, initiant ainsi l'assemblage de Gag au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Cette multimérisation, favorisée par le domaine CA, induit l'exposition du myristate N-terminal de la MA et, de concert avec la région HBR et les lysines 25-KK-26, permet l'interaction spécifique de Gag à la membrane plasmique. Les virions totalement assemblés bourgeonnent alors après un assemblage complet, en gardant l'arrangement moléculaire de ses composés (figure 24).

Pourtant, le VIH-1 ne s'assemble pas de manière uniforme à la membrane. Il présente en effet une distribution discrète au niveau de sites particuliers de la membrane [Ono et al., 2004]. Pour comprendre ce phénomène, la question de la composition lipidique de ces domaines a été étudiée.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 25 : Simulation informatique de l'orientation du domaine MA à la surface de la membrane en interaction avec le PIP2. La MA est représentée en marron avec les résidus basiques nécessaires à l'interaction avec le PIP2 en blanc. Le PIP2 est représenté en bleu et le myristate, ancré dans la membrane, en jaune. - Source : Charlier et al., 2014

2.2.2. Les interactions membranaires et le rôle des lipides dans l'assemblage viral

Nous l'avons vu, la composition lipidique de la particule virale diffère de la composition totale de la membrane plasmique des cellules productrices. En effet, elle est enrichie notamment en PI(4,5)P2, cholestérol, sphingomyéline et lipides saturés. De plus, il a été montré que les virus produits par les macrophages et les cellules T présentent une composition lipidique similaire, bien que la composition totale de ces deux types cellulaires soit différente [Chan et al., 2008]. Ceci tend à montrer qu'il existe une relation particulière entre Gag et les lipides membranaires lors de l'assemblage viral.

La composition lipidique des virus est proche de la composition des « rafts lipidiques », suggérant pour certains que le VIH-1 s'assemble préférentiellement au niveau de ces domaines résistants aux détergents [Ono et al., 2001]. Cependant, ce modèle est largement controversé, d'autres préférant l'hypothèse selon laquelle le VIH-1 recrute les composants lipidiques et protéiques au cours de la multimérisation de Gag au niveau de son site d'assemblage afin de créer un environnement favorable à son assemblage [Hogue et al., 2011 ; Kerviel et al., 2014].

La MA interagit avec la membrane via des interactions électrostatiques avec les lipides acides tels que la PS et le PI(4,5)P2, auxquelles vient s'ajouter une composante hydrophobe grâce à l'ancrage du myristate exposé qui s'insère dans le cœur des chaînes d'hydrocarbures de la membrane. Cependant, *in vitro*, le myristate n'augmente que faiblement l'association membranaire de la MA en absence de cholestérol et de PI(4,5)P2 [Barros et al., 2016]. Pour expliquer cela, l'hypothèse de l'équipe de M. Lösche est que l'équilibre thermodynamique $[myr(s)]/[myr(e)]$ du myristate dépend également de la densité de charges de la membrane avec laquelle Gag interagit. Ceci suggère que la composition lipidique de la membrane est un facteur déterminant pour favoriser ou défavoriser l'assemblage membranaire, via la stabilisation ou déstabilisation de l'interaction de Gag avec son site d'assemblage. Ainsi, selon eux, la composition lipidique du site d'assemblage joue un rôle coopératif dans l'interaction des lipides avec le domaine MA, suggérant leur recrutement sélectif au niveau du site d'assemblage et donc dans la particule virale [Barros et al., 2016].

Ces résultats viennent confirmer les observations de l'équipe d'A.Vogt qui a démontré que l'interaction Gag/membrane était favorisée par une composition en lipides dont les deux chaînes acyls sont insaturées. L'ajout de cholestérol augmente l'affinité membranaire de Gag et induit un rapprochement des phospholipides. Ils retrouvent également l'effet coopératif du PI(4,5)P2 et du cholestérol quant à l'accrochage membranaire de Gag. Leur étude conclue de l'importance de l'environnement lipidique comme régulateur positif de la stabilité d'interaction Gag/membrane, avec une mise en lumière de l'importance de la PS insaturée, la concentration en cholestérol et la présence de PI(4,5)P2 [Dick et al., 2012]. Le cholestérol et les lipides insaturés semblent ainsi faciliter l'interaction de la MA avec les membranes (et plus spécifiquement du PI(4,5)P2 avec Gag) et l'organisation moléculaire de Gag le long du feuillet membranaire.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 26 : Modèle illustrant l'interaction dynamique des différentes espèces de Gag. Gag cytosolique interagit dynamiquement avec l'ARN (cadre vert : espèce 1a et 1b), donnant lieu à une espèce de Gag diffusant normalement, bien que lente (espèce 1), ainsi qu'à une population de Gag oligomérisé dont la diffusion est confinée (espèce 2). L'altération des interactions avec l'ARN via la mutation du domaine NC ne rend pas la protéine complètement librement diffusive, suggérant l'impact d'autres composants cytosoliques toujours en interaction avec Gag (espèce 1b et illustré par une ellipse grise). Les espèces observées pour chaque mutant sont représentées en bas. MW = poids moléculaire, myr = myristoyl.
Source : Hendrix et al., 2015

La simulation structurale présentée par Charlier et al. a montré que le positionnement du HBR favorisant son interaction avec le PI(4,5)P2 conduisait au confinement des PI(4,5)P2 autour de la MA via des interactions électrostatiques (figure 25). Cette accumulation de PI(4,5)P2 pourrait alors être favorable à la multimérisation locale de Gag, et participer au maintien stable de Gag à la membrane [Charlier et al., 2014]. Le résultat de simulation est donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'assemblage de Gag induit la coalescence des composants membranaires favorables à un assemblage viral efficace.

2.3. La dynamique cytosolique et membranaire de Gag

La dynamique de la protéine Gag durant son transport à la membrane et lors de son assemblage membranaire est une question majeure pour améliorer la compréhension du processus menant à la formation d'une particule virale. De nombreuses études, utilisant des méthodes de microscopie en cellules vivantes, ont adressé cette question.

Il semblerait ainsi que la protéine Gag soit majoritairement monomérique ou dimérique dans le cytosol [Ivanchenko et al, 2009 ; Sebla et al., 2010 ; Hendrix et al., 2015 ; El Meshri et al., 2015]. Cependant, une petite population de Gag qui oligomérisait dans le cytosol a été décrite, la CA et la NC jouant apparemment un rôle dans leur formation [Larson et al., 2003 ; Derdowski et al., 2004 ; Hubner et al., 2007 ; Hogue et al., 2009]. Plus récemment, il a été montré que cette population cytosolique minoritaire correspond à de petits oligomères de Gag interagissant le long de l'ARN viral [Sebla et al., 2010 ; Hendrix et al., 2015 ; El Meshri et al., 2015]. La stoechiométrie de ces petits clusters reste cependant une question ouverte : l'équipe de Don. C Lamb a mis en évidence des mono-tétramères cytosoliques en interaction avec l'ARNv [Hendrix et al., 2015] tandis que les résultats de H. De Rocquigny suggèrent l'existence d'une petite population d'oligomères complexés à l'ARN qui s'assemble progressivement durant leur transport vers la membrane plasmique [El Meshri et al., 2015]. A l'inverse, Jouvenet et al. avaient estimé que les protéines Gag liées à l'ARNv dans le cytosol diffusaient sous forme de dimères [Jouvenet et al., 2009]. Quelle que soit leur stoechiométrie, la présence de ces oligomères cytosoliques de Gag dépend de la concentration intracellulaire de Gag [Sebla et al., 2010 ; Fogarty et al, 2011 ; Hendrix et al., 2015].

Grâce à l'imagerie en cellule vivante et l'analyse par RICS et ccRICS, Hendrix et al ont déterminé le coefficient de diffusion de la population monomérique de Gag cytosolique à $2.8\mu\text{m}^2/\text{s}$ tandis que les mono-tétramères de Gag en interaction avec l'ARNv observés diffusent de manière confinée à $0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$. Selon eux, leurs observations mettent en évidence le rôle de facteurs cellulaires déviant les protéines Gag cytosoliques d'un profil purement diffusif (figure 26) [Hendrix et al., 2015]. Dans toutes ces études, l'interaction entre le domaine NC de Gag et l'ARN semble requise pour permettre cette oligomérisation cytosolique [El Meshri et al., 2015 ; Hendrix et al., 2015 ; Sebla et al., 2010]. Ces oligomères cytosoliques représentent une population minoritaire par rapport à la population totale de Gag, et leur organisation moléculaire semble

moindre, n'induisant pas de multimérisation de haut ordre moléculaire comme il est possible de l'observer à la membrane plasmique au cours de l'assemblage viral [Sebla et al., 2010]. Don C Lamb interprète leur présence comme un possible initiateur de la multimérisation membranaire de Gag : ces tétramères liés à l'ARNv vont interagir avec la membrane et permettre le recrutement de Gag au niveau du site d'assemblage ainsi formé, et initier l'assemblage de Gag le long du feuillet interne de la membrane plasmique [Hendrix et al., 2015]. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Ivanchenko et al., qui a montré que l'assemblage membranaire de Gag était réalisé grâce au recrutement de monomères de Gag diffusant en interaction avec la membrane ou venant directement du cytosol [Ivanchenko et al., 2009].

L'équipe de Lippincott-Schwartz a étudié l'impact des micro-ARN (miRNA) cellulaires sur la dynamique de Gag-(i)mEOS2 (protéine Gag dont le fluorophore mEOS2 a été fusionné entre les domaines MA et CA) à la membrane plasmique de cellules embryonnaires de rein humaines (HEK 293T) par spt-PALM [Chen et al., 2014]. Leur objectif était d'altérer le recrutement d'ARN cellulaire ou viral : les miRNA utilisés n'ont donc pas de site sur les transcrits du VIH et n'existent pas dans les cellules utilisées. Ils ont mis en évidence que l'interaction miRNA/Gag altérait la dynamique membranaire de Gag, induisant un défaut de multimérisation et d'assemblage viral. Cette altération était cependant réversible après l'ajout de l'ARNm cible des miRNA. Ils ont déterminé que la protéine Gag-(i)mEOS2 WT diffusait à la membrane avec un coefficient de diffusion de $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$. En présence de miRNA, la diffusion des protéines Gag augmentait à $0.18\mu\text{m}^2/\text{s}$ [Chen et al., 2014]. Selon eux, les complexes d'assemblage défectueux étaient alors endocytés et dégradés par la voie lysosomale [Chen et al., 2014]. Leurs travaux mettent donc également l'accent sur l'importance de l'ARN et son rôle structural dans la dynamique d'assemblage de Gag à la membrane.

Jouvenet et al., ont étudié la dynamique de l'incorporation de l'ARNv lors de l'assemblage viral : ils ont trouvé que, si l'ARNv diffuse librement lorsqu'il est exprimé seul dans les cellules, sa co-expression avec les protéines Gag retient ces molécules d'ARNv à la membrane. Dans ce cas, les molécules d'ARNv diffusent latéralement avant d'être arrêtées par l'assemblage de Gag autour de ce complexe Gag/ARN [Jouvenet et al., 2009]. Le complexe ARN/Gag est alors ancré de manière irréversible dans la membrane. Avant la multimérisation de Gag cependant, l'interaction ARN/Gag est réversible, et les défauts de multimérisation de Gag induisent une dissociation du complexe [Jouvenet et al., 2009]. Cette étude a été récemment contredite par l'équipe de W.S. Hu, qui a trouvé grâce au suivi de molécule unique que l'ARNv diffusait librement en présence ou en absence de Gag. L'ARNv aurait donc une diffusion brownienne, dont la dynamique serait dépendante de son environnement direct mais dont le transport serait sans corrélation avec le cytosquelette d'actine ou l'expression de Gag [Chen et al., 2014]

Le temps caractéristique d'assemblage viral a été étudié notamment par Jouvenet et al. en 2008 et Ivanchenko et al. en 2009. Grâce aux méthodes de microscopie FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) et par illumination

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 27 : Schéma des comportements séquentiels de composants viraux et cellulaires durant l'assemblage de VIH 1 (compilé de plusieurs expériences réelles différentes), reflétés par TIR-FM. L'intensité de fluorescence au fil du temps à un site d'assemblage d'une particule virale est tracée et une interprétation des données de fluorescence est représentée selon le diagramme. Les différents composants viraux et les facteurs de la cellule hôte sont indiqués selon un code des couleurs de la même façon sur le schéma et le diagramme : Gag, rouge; ARN viral (vRNA), vert; ALIX, gris; ESCRT-III, bleu; VPS4, violet.
Source : Jouvenet et al. 2011

en TIRF (*total-internal-reflection fluorescent microscopy*), Jouvenet et al. ont montré que les virions apparaissaient individuellement à la membrane plasmique, suivi d'une accélération de l'assemblage où les protéines Gag s'accumulent menant à un assemblage complet en 5 à 6 minutes pour un virion individuel [Jouvenet et al., 2008]. L'équipe de D. Lamb a montré par microscopie TIRF que 90% de l'assemblage d'un virion était achevé en 8 à 9 minutes. Cependant, ils ont observé un retard dans la libération de la particule virale formée, qui ne semblait être libérée dans le milieu extracellulaire que 25+/-11minutes après le début de l'assemblage [Ivanchenko et al., 2009] (figure 27).

2.4. Assemblage et domaines membranaires

Le mécanisme d'assemblage du VIH-1 n'est pas sans rappeler le mécanisme de formation des exosomes. En effet, il existe des similarités non négligeables quant à la composition lipidique et protéique des exosomes et des particules de VIH-1 [Nguyen et al., 2003]. Tous deux présentent un enrichissement en cholestérol et glycosphingolipides comparé à la membrane plasmique, et un enrichissement en protéines membranaires telles que les tétraspanines. Ces similitudes ont mené à l'hypothèse selon laquelle les rétrovirus utilisent la voie préexistante de biogénèse des exosomes non viraux pour la formation de particules virales. Cette hypothèse est appelée "*Trojan exosome hypothesis*" [Gould et al., 2003]. Les tétraspanines sont connues pour créer des réseaux de complexes protéiques associés en microdomaines. Ces domaines interagissent avec le cholestérol et semblent jouer le rôle d'organisateur de domaines lipidiques spécifiques. Ces domaines (appelés "endosome-like domains", ou encore TEM "tetraspanin-enriched domains" selon l'auteur y faisant référence) colocalisent avec la protéine Gag. De manière générale, les sites d'assemblage de Gag sont enrichis en tétraspanines telles que CD9, CD63, CD81 et CD82. Il a donc été proposé que Gag s'assemble au niveau de ces TEM [Booth et al., 2006 ; Jolly et al., 2007]. Par ailleurs, les particules virales du VIH-1 sont enrichies, à l'instar des exosomes, en CD63 et CD81. Plus particulièrement, la CD81 joue un rôle important dans la spécificité de localisation cellulaire de Gag [Grigorov et al., 2009]. Cependant, le rôle exact joué par les tétraspanines dans l'assemblage reste à définir.

Ces observations sont concordantes avec les observations selon lesquelles Gag peut s'assembler dans les endosomes selon la lignée cellulaire étudiée [Perlman et al., 2006 ; Nydegger et al., 2003 ; Sherer et al., 2003]. Ainsi, il est possible que Gag utilise les voies de biogénèse exosomale pour bourgeonner ou bien qu'il détourne les domaines membranaires déjà existant à son avantage. Les travaux de l'équipe d'E. Bertrand confirment cette hypothèse. Selon eux, des preuves fonctionnelles montreraient que Gag et son ARNv utilisent 2 voies de trafic intracellulaire : une première où Gag semble cibler directement la membrane, et une autre passant par la voie endosomale [Molle et al., 2009].

Il est important de noter que la localisation cellulaire de l'assemblage du VIH-1 dépend du type cellulaire infecté. En effet, dans les lymphocytes T et lignées cellulaires associées,

l'assemblage se situe majoritairement au niveau de la membrane plasmique. En revanche, dans les macrophages, des particules virales matures et immatures sont retrouvées dans des compartiments intracellulaires similaires aux endosomes [Raposo et al., 2002 ; Pelchen-Matthews et al., 2003]. Ces vésicules intracellulaires, appelées VCCs (*virus-containing compartments*), sont en réalité des invaginations profondes de la membrane plasmique, reliées transitoirement au milieu extracellulaire via des structures tubulaires [Benett et al., 2009]. Les travaux de Mlacova et al., ainsi que Gerber et al., ont montré une colocalisation entre le marqueur PH_{PLC- δ} , spécifique des PI(4,5)P2, la tétraspanine CD81 et Gag au niveau des sites d'assemblage intracellulaires des macrophages, suggérant la présence de PI(4,5)P2 au niveau de la membrane des VCCs [Mlcochova et al., 2013 ; Gerber et al., 2015]. Il a donc été suggéré que la localisation de Gag dans les VCCs des macrophages était également due à un mécanisme régulé par le PI(4,5)P2 et l'ARN, à l'instar du mécanisme observé en lymphocytes. Cependant, une étude récente a montré que la localisation de Gag dans les VCCS dépendait plus de la multimérisation induite par la NC de Gag. De plus, bien que le PI(4,5)P2 joue toujours un rôle important dans l'ancrage de Gag à la membrane, le rôle de l'interaction MA/PI(4,5)P2 ne semble pas aussi nécessaire à l'assemblage de Gag que dans les lymphocytes [Inlora et al., 2016].

Les observations faites en macrophage sont concordantes avec ce qui a été observé dans les Lymphocytes T polarisés. En effet, dans ces cellules, Gag est préférentiellement retrouvée au niveau des uropodes de la membrane plasmique. Ces régions correspondent à une protrusion à l'arrière de la cellule permettant de détecter le sens du flux sanguin et d'orienter le lymphocyte en conséquence [revue sur le rôle des uropodes des lymphocytes : Sanchez-Madrid et al., 2009]. Lorsque ces cellules sont infectées par le VIH-1, les uropodes servent de site de contact entre les cellules T infectées et non infectées et participent à la formation des synapses virologiques et ainsi à la transmission de cellule à cellule du VIH-1 [Llewellyn et al., 2010]. La membrane des uropodes est enrichie en protéines également retrouvées dans la composition de VCCs, telles que les tétraspanines CD9, CD44, CD81 et CD82 [Llewellyn et al., 2013]. Il est intéressant de noter que le ciblage de Gag aux uropodes est indépendant de la MA, du moins tant que ce domaine est remplacé par un domaine d'interaction aux membranes, même aspécifique. En revanche, la multimérisation de Gag médiée par la NC est indispensable à un assemblage efficace [Llewellyn et al., 2013].

Toutes ces études ont cependant en commun d'utiliser un substitut d'adressage membranaire pour remplacer la MA. Ainsi, même si ce domaine n'est pas systématiquement requis pour réaliser le processus d'assemblage, la MA semble tout même essentielle à la localisation cellulaire de Gag, du moins en tant que signal d'adressage, et quel que soit le type cellulaire utilisé par le VIH-1. Cependant, il semblerait effectivement que le maintien de Gag à son site d'assemblage n'est pas nécessairement régulé par la MA. Ainsi, la multimérisation de Gag semble, du moins dans le cas de l'assemblage dans les macrophages et au niveau des

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 28 : Changements conformationnels de l'ARNv régulant sa traduction ou sa dimérisation.
L'ARNv présente 2 conformations: une conformation qui permet des interactions longue distance (LDI pour *long distance* interaction) et expose le codon start du gène gag et une conformation contenant plusieurs boucles interconnectées (BMH pour *branched multiple-hairpin*) qui permet la dimérisation de l'ARNv. Vert : TAR - Orange : PolyA - Bleu : PBS - Rose : DIS - Gris : Site donneur SD - Jaune : signal psi Ψ .

source: *Abbink et al., 2005*

uropodes, plus importante que la MA pour la stabilité de sa localisation intracellulaire. Pour conclure, la localisation cellulaire de Gag est régulée par les différents domaines de Gag qui agissent de concert pour cibler spécifiquement les membranes et induire un environnement favorable à la formation d'une particule virale. L'objectif final est de former une particule virale qui sera capable d'infecter de nouvelles cellules. En ce sens, l'encapsidation de l'ARNv au sein de la particule est un événement primordial

2.5. L'encapsidation de l'ARNv

La plupart des particules virales contiennent 2 brins d'ARNv, suggérant que son encapsidation est régie par un processus efficient. Suite à son export Rev-dépendant du noyau vers le cytoplasme, l'ARN non épissé peut soit servir de matrice pour la traduction des précurseurs Gag/GagPol, soit être encapsidé dans la particule virale en tant que génome. L'équilibre traduction/encapsidation est régulé par un changement de conformation de la région 5' de l'ARNv qui peut soit présenter le codon start du gène *gag* (conformation LDI pour *Long Distance Interaction*) et ainsi induire la traduction de l'ARNv ; soit exposer le signal de dimérisation DIS de l'ARN (conformation BMH pour *Branched multiple-hairpin*), favorisant ainsi la dimérisation de l'ARNv et son encapsidation (figure 27) [Huthoff et al., 2001 ; Kenyon et al., 2011]. *In vitro*, la conformation BMH semble favorisée lorsque l'ARN est lié au domaine NC : la protéine Gag est donc capable de réguler sa propre expression. En effet, une faible concentration intracellulaire de Gag stimule sa traduction tandis qu'elle est inhibée à plus haute concentration en faveur du transport de l'ARNv vers le site d'assemblage [Anderson et al., 2006].

Gag reconnaît l'ARNv via la séquence signal Ψ (cf section 2.1.3 - figure 20 - page 32). Les travaux de Nikolaitchik et al. ont suggéré que le VIH-1 était capable d'encapsider deux copies d'ARN, quelque soit leur taille. Par ailleurs, ils ont montré que les ARNs modifiés afin de former des dimères intramoléculaires (chaque copie possède 2 sites de dimérisation DIS) étaient également encapsidés. Leurs observations indiquent donc que le VIH-1 reconnaît l'ARNv et que la spécificité semble augmenter lorsque l'ARN est dimérisé [Nikolaitchik et al., 2013]. En effet, la conformation favorisant la dimérisation de l'ARN (conformation BMH) expose également le site spécifique de liaison à la NC.

L'interaction ARN/Gag intervient en premier lieu dans le cytoplasme. Grâce à des méthodes de microscopie de fluorescence en cellule vivante, la dynamique spatio-temporelle de l'interaction Gag/ARNv a été étudiée. Le suivi de molécules d'ARN individuelles a permis de mettre en évidence que l'ARN était adressé à la membrane plasmique mais ne restait à proximité que quelques secondes [Jouvenet et al., 2009]. En réalité, il semblerait que l'ARNv diffuse à proximité de la membrane beaucoup plus longtemps, mais que les techniques de microscopie TIRF ne peuvent pas les détecter [Sardo et al., 2015]. La dynamique d'association de Gag avec l'ARNv est encore peu comprise : ni la proportion d'ARNv interagissant avec Gag dans le cytoplasme, ni

la proportion d'ARNv qui arrive à la membrane en association avec Gag n'ont pas encore pu être mises en évidence. Cependant, le temps de résidence des ARNv à la membrane dans les cellules exprimant Gag est significativement plus long qu'en absence de Gag. Ceci suggère que la plupart des ARNv détectés à proximité de la membrane sont associés avec Gag [Sardo et al., 2015].

La dernière étape de l'assemblage viral pour aboutir à un processus productif est la régulation de la multimérisation de Gag. En effet, la stœchiométrie de Gag au sein des particules virales semble être un processus finement régulé, dont les acteurs et la dynamique reste encore incompris à ce jour. La fin de la multimérisation de Gag correspond à la dernière étape avant le recrutement des complexes ESCRT permettant la scission du bourgeon viral.

2.6. L'incorporation des protéines d'enveloppe

Le mécanisme d'incorporation des spicules d'enveloppe est encore peu compris. Nous l'avons vu, les spicules sont composés de deux glycoprotéines SUgp120 et TMgp41 interagissant entre elles par des interactions non covalentes, et associées en trimères. On obtient donc un homotrimère des ces dimères (cf figure 11 - page 14). La SUgp120 est exposée à l'extérieur de la membrane tandis que la TMgp41 est composée d'une portion transmembranaire et d'une longue queue cytoplasmique d'~150 acides aminés. Cette queue cytoplasmique est nécessaire pour l'incorporation de l'Env dans les particules virales [Murakami et al., 2000 ; Akari et al., 2000]. En effet, elle interagit avec la MA de Gag, et notamment avec les trimères de MA, qui sont nécessaires à l'incorporation des protéines d'enveloppe [Tedbury et al., 2015]. Lorsque la particule est immature, le complexe Env est non fusogénique (pas de fusion des membranes virales et cellulaires possible lors de l'entrée du virus). En revanche, la fusion membranaire est activée lors du clivage de Gag par la protéase virale. L'activité fusogénique peut être retrouvée en tronquant TMgp41 de sa queue cytoplasmique, même en condition immature [Murakami et al., 2004]. Ceci suggère que Gag immature interagit avec la queue cytoplasmique de TMgp41, imposant une conformation empêchant la fusion membranaire, et induit ainsi l'aspect non infectieux des particules immatures.

La dépendance de la queue cytoplasmique de l'enveloppe dans son incorporation dans la particule virale varie en fonction du type cellulaire infecté, supposant le rôle de certains facteurs cellulaires [Murakami et al., 2000]. Certains facteurs cellulaires ont en effet été mis en évidence pour avoir un rôle dans le trafic et l'incorporation de l'enveloppe. Par exemple, Rab11/FIP1C (Rab11 family-interacting protein 1 isoform C) agit sur le transport de l'enveloppe à la membrane plasmique et sur l'incorporation dans les particules virales [Qi et al., 2013]. TIP47 (tail-interaction protein de 47kDa) jouerait également un rôle dans l'incorporation de l'env [Blot et al., 2003 ; Lopez-Vergès et al., 2006], bien que le rôle exact de ce dernier soit encore débattu [Checkley et al., 2013].

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 29 : Modèles de scission membranaire médiée par les complexes ESCRT III. Dans les deux modèles, la protéine Gag du VIH-1 interagit avec ESCRT-I et la protéine ALIX qui recrute ESCRT-III. La scission membranaire est conduite par la polymérisation de ESCRT-III de concert avec la protéine VPS4. **A. Premier modèle:** ESCRT-III est localisé au sein de la particule virale - adapté de *Van Engelenburg, S. B. et al. Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. Science 343, 653–656 (2014).* **B. Second modèle:** ESCRT-I et ALIX sont localisés au sein de la particule virale et recrutent ESCRT-III et VPS4 qui sont principalement localisés à l'extérieur du bourgeon viral. - adapté de *Cashikar et al., 2014.* Env=enveloppe.

Source: Freed EO, 2015

2.7. Le rôle des co-facteurs cellulaires dans les étapes tardives de la réplication virale

2.7.1. La libération ESCRT-dépendante de la particule virale

Après l'assemblage de Gag et de ses composants viraux et cellulaires à la membrane, le bourgeon viral doit subir une scission membranaire pour être relargué dans le milieu extracellulaire. Cette étape est médiée par le recrutement par le domaine p6 de Gag des complexes ESCRT. Les protéines composant les ESCRT appartiennent à la classe des VPS-E (vacuolar protein sorting de classe E), qui regroupe les protéines impliquées dans la biogénèse des endosomes tardifs. Elles sont connues pour jouer un rôle décisif dans les événements de scission membranaire lors du trafic protéique et la cytodierèse cellulaire. Comme nous l'avons vu plus tôt (section 2.1.6, page 37), p6 contient 2 domaines tardifs nécessaires au recrutement des ESCRT, :

- Le domaine PTAP, situé à l'extrémité N-terminale de p6 est le domaine majeur pour le recrutement des ESCRT: il interagit directement avec la protéine Tsg101 (*Tumor susceptibility gene 101*), qui appartient au complexe ESCRT-I.
- Le domaine YPxL, bien qu'il ne soit pas le facteur dominant de la scission membranaire, est également requis pour un relargage efficace du bourgeon viral. Il permet le recrutement de la protéine ALIX (*ALG2-interacting protein X*), protéine des complexes ESCRT-I et ESCRT-III.

Le recrutement de ces complexes va induire la scission du cou du bourgeon viral et permettre ainsi la libération de la particule virale dans le milieu extracellulaire.

D'un point de vue dynamique, Tsg101 est recruté au site de multimérisation de Gag au cours de l'assemblage. Une fois que la nucléation de Gag est terminée dans le bourgeon viral, la protéine CHMP4 (charged multivesicular body protein 4b), un composant du complexe ESCRT-III est recruté transitoirement au site d'assemblage [Morita et al., 2011]. Deux autres protéines du complexe ESCRT-III, CHMP2 et CHMP3 sont recrutées et agissent de manière synergique afin de stabiliser l'intérieur du cou viral en formant une structure en forme de dôme [Lata et al., 2008 ; Hanson et al., 2009 ; Bodon et al., 2011 ; Effantin et al., 2013]. La protéine Vps4A, une ATPase, est enfin recrutée pour apporter l'énergie nécessaire à la scission membranaire [Bleck et al., 2014], et ainsi libérer la particule virale. Cependant, le mécanisme exact par lequel la machinerie ESCRT mène à la scission membranaire reste à définir (figure 29) [Freed, 2015].

Concomitant à l'assemblage et après la libération du virus, la protéase orchestre le clivage protéolytique des précurseurs Gag et GagPol. Ce processus va induire des changements conformationnels importants des domaines de Gag et permettre la formation d'une particule virale mature et infectieuse.

2.7.2. Le rôle des co-facteurs cellulaires dans l'assemblage viral

Les étapes tardives de Gag se déroulent dans le cytosol et majoritairement à la membrane plasmique. Durant son trafic intracellulaire, Gag est à proximité ou en contact avec de nombreux facteurs cellulaires. L'étude des agents cellulaires impliqués dans les étapes tardives de la réplication virale est complexe. Certains facteurs ont été largement étudiés, tels que l'importance de l'environnement lipidique et du PI(4,5)P2 dans le ciblage de Gag à son site d'assemblage, ou le recrutement de Tsg101, ALIX, et Vps4 pour la scission membranaire. Il a également été montré que la NC pouvait interagir avec les ARN cellulaires de manière relativement aspécifique via sa région basique. Cependant, d'autres facteurs semblent impliqués dans les étapes tardives de la réplication virale, mais leur fonction dans l'assemblage n'est pas toujours très bien comprise. Par exemple, nous avons vu que la particule virale présentait des similitudes avec les exosomes, et que les protéines cellulaires impliquées dans la biogénèse exosomale comme les tétraspanines étaient enrichies aux sites d'assemblage. Leur rôle exact dans l'assemblage reste, encore aujourd'hui, une question ouverte. Nous allons ici nous arrêter brièvement sur certains acteurs cellulaires mis en lumière pour avoir un rôle facilitant lors des étapes tardives de l'assemblage viral.

L'ATPase cellulaire ABCE1 (ATP binding cassette protein E1, aussi connue sous le nom de HP68), a été décrite pour faciliter l'assemblage viral. Cette protéine est connue pour permettre la dissociation des sous-unités ribosomales en fin de traduction. Sa fonction dans l'assemblage reste à définir mais il a été montré qu'elle interagissait transitoirement avec Gag lorsque celui-ci était clusterisé [Dooher et al., 2007]. Les auteurs proposent un modèle selon lequel ABCE1 crée un complexe avec Gag afin de favoriser sa multimérisation. Ce modèle est appuyé par les résultats que le même groupe a obtenu plus tard, mettant en évidence un complexe nucléoprotéique contenant Gag, l'ARNv, ABCE1 et également une autre protéine cellulaire, DDX-6, dans des cellules T chroniquement infectées [Robinson et al., 2014]. DDX6 (DEAD-box RNA helicase), est une hélicase à ARN capable d'hydrolyser l'ATP. L'inhibition de l'expression de DDX-6 par siRNA induit une réduction de production de VLPs, qui est rétablie grâce à l'apport de DDX-6 native, mais pas lors de l'ajout de DDX-6 mutée pour empêcher l'hydrolyse d'ATP [Reed et al., 2012]. Comme ABCE1, DDX-6 interagit avec les clusters de Gag, indépendamment de l'ARN, ce qui semble indiquer une interaction directe avec Gag. L'hypothèse des auteurs est que ce complexe favoriserait le recrutement de l'ARNv par Gag et faciliterait ainsi sa nucléation le long de l'ARNv.

Staufen1, une protéine se liant à l'ARN double brin, agirait également en modulateur de la multimérisation de Gag et de l'encapsidation de l'ARNv. Elle est recrutée au site d'assemblage mais son interaction avec Gag, indirecte, est médiée par l'ARNv. Staufen1 semble jouer un rôle dans la traduction et la multimérisation de Gag [Mouland et al., 2000 ; Chatel-Chaix et al; 2007]. Selon Lingappa et al., Staufen1 pourrait faire partie du complexe avec ABCE1 et DDX-6, ce qui

Les protéines du VIH-1						
Protéine virale		Copies/virions	Interaction avec d'autres facteurs viraux	Fonctions majeures de la protéine virale	Partenaires cellulaires	Fonction des partenaires cellulaires ; Résultat de l'interaction avec les protéines virales
Protéines de structure (issues du précurseur pr55Gag)	Matrice, MA (p17Gag)	~2000/2500	Queue cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire TMgp41	Adressage spécifique à la membrane plasmique ; Incorporation de Env ; événements post-entrée	PI(4,5)P2 TIP47	Interaction Gag/membrane Incorporation de l'enveloppe dans les virions
	Capside, CA (p24Gag)	~2000/2500	Capside	Structure du core viral et multimérisation de Gag lors de l'assemblage	Cyclophiline A TRIM5α	Module la sensibilité à TRIM5α Inhibiteur de l'infection au niveau des événements post-entrée
	Nucléocapside, NC (p7Gag)	~2000/2500	ARNv du virus	Encapsidation de l'ARNv ; chaperonne de l'ARNv ; multimérisation de Gag lors de l'assemblage viral	ABCE1/HP68 APOBEC3G et F tRNA-Lys 3 ARNs cellulaires riches en G/U ou riches en A	Promeut l'assemblage viral Encapsidé dans la particule virale via son interaction avec l'ARNv ; inhibiteur de l'infection ; G-to-A hypermutation Primer pour la reverse transcription Multimérisation de Gag en absence d'ARNv ; plateforme structurale lors de l'assemblage ; inconnu à ce jour
	p6Gag	~2000/2500	Vpr	Bourgeonnement viral	Tsg101 ALIX	Recrutement des complexes ESCRT pour la scission membranaire et la libération de la particule virale
Enzymes virales (issues de pr160Gag-Pol)	Protéase, PR	~100/125	Gag, Pol	Clivage protéolytique des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol		Pourrait cliver des protéines cellulaires
	Reverse transcriptase, RT	~100/125	ARNv, IN	Synthèse de l'ADNc ; le domaine RNaseH dégrade l'ARN des brins hybrides ARN/ADN	tRNA-Lys 3	Primer pour la reverse transcription
	Intégrase, IN	~100/125	ADNc viral, RT	Insertion covalente de l'ADNc viral dans le génome de l'hôte	LEDGF/p75 UNG2	Intégration de l'ADNc ; cible les gènes actifs Enzyme de réparation de l'ADN ; améliore la fidélité de réplication
Enveloppe virale (issue de gp160Env)	Glycoprotéine de surface, SUgp120	4 à 35 trimères	Glycoprotéine transmembranaire TMgp41	Liaison aux récepteurs transmembranaires de la surface cellulaire ; permet l'attachement viral et l'entrée	CD4 Co-récepteurs CCR4/CXCR4 Molécules d'adhésion (type intégrine, protéoglycannes héparane sulfates...)	Entrée du VIH-1 dans la cellule cible ; déterminants majeurs du tropisme viral Capture du virus à la surface de la cellule
	Glycoprotéine transmembranaire, TMgp41	4 à 35 trimères	SUgp120, MA	Contient le peptide de fusion nécessaire à l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible	TIP47 Machinerie d'endocytose clathrine-dépendante (AP-1, AP-2)	Incorporation de l'enveloppe dans les virions Sous-expression membranaire des protéines d'enveloppe
Protéines régulatrices	<i>trans</i> -activateur de la transcription, Tat	incorporation de Tat débattue	ARNv via la séquence TAR	Facteur d'élongation de la transcription virale	Cycline T1 Importine-β/Karyopherine-β1	La cycline T avec CDK9 forment le complexe p-TEFb qui promeut la transcription Récepteur d'import nucléaire
	Régulateur de l'expression des protéines virales, Rev	aucune à ce jour	ARNv via la séquence RRE	Export nucléaire des ARNm mono-épissés et non épissés (contenant des introns)	CRM1/exportine 1 Importine-β/Karyopherine-β1	Récepteur d'export nucléaire ; transport des complexes Rev/ARNm du noyau vers le cytoplasme Récepteur d'import nucléaire
Protéines accessoires	Facteur d'infectivité virale, Vif	1 à 150		Supprime la restriction induite par APOBEC3G et F	APOBEC3G et F complexe CUL5-E3	Vif recrute l'ubiquitine ligase Cullin5-ElonginB/C-Rbx E3 pour dégrader APOBEC3G et F
	Protéine virale R, Vpr	~700	p6	Promeut l'infectivité virale post-entrée ; arrêt du cycle cellulaires en G2/M	DCAF1/VprBP nucleoporines UNG2 CDC25C	Interagit avec Vpr et des facteurs cellulaires inconnus à ce jour pour une dégradation via le complexe ubiquitine ligase Cul4-E3 Import nucléaire post-entrée Enzyme de réparation de l'ADN ; améliore la fidélité de réplication Arrêt du cycle cellulaire en G2/M
	Protéine virale U, Vpu	aucune à ce jour		induit la dégradation de CD4 et BST2 ; permet la libération des particules virales	CD4 β-TrCP BST2/Tetherin/CD317	Vpu recrute l'ubiquitine ligase Cull1-E3 pour la dégradation du récepteur CD4 Bloque la libération de la particule virale néo-formée ; Vpu augmente son taux de dégradation
	Facteur négatif, Nef	A priori présent dans les virions		Dégradation CD4, MHC ; activation des cellules T ; facteur d'infectivité des virus ; bloque l'apoptose cellulaire ; déterminant de la pathogénicité virale	CD4, protéines de la surface cellulaire (CD28, MHC-I, MHC-II, TCR-CD3...) AP-1, AP-2, AP-3, β-COP, ATPase vacuolaire, famille des protéines kinase SRC Famille des protéines kinase SRC ; Kinases (PAK2, LCK, ASK-1) Dynamin 2	Nef connecte des protéines de la surface cellulaire importantes pour la détection immunologique des cellules infectées aux voies de dégradation clathrine-dépendantes et -indépendantes en vue de réguler la dégradation immune du virus Dérégulation du remodelage cellulaire via l'actine ; rôle dans la transduction du signal ; bloque l'apoptose ; stimule la réplication virale Améliore l'infectivité virale

Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions et partenaires des protéines virales. Adapté de Swanson & Malim, Cell, 2008

impliquerait la formation d'un large complexe protéique interagissant avec Gag dans le cytosol et à la membrane plasmique. Ce complexe favoriserait la multimérisation de Gag jusqu'à atteindre la quantité nécessaire de Gag pour la formation d'une particule virale [Lingappa et al., 2015].

La capsidie interagit avec la cyclophiline A, une peptidyl-prolyl-isomérase (PPI), permettant l'isomérisation des protéines de conformation *cis* en conformation *trans*. Elle est encapsidée dans la particule virale du VIH-1 grâce à son interaction avec la boucle riche en prolines située entre les deux domaines NTD et CTD de la CA [Bosco et al., 2010]. Luban J. et He. H. ont proposé en 2012 que cette interaction avec la cyclophiline A permettrait d'outrepasser les fonctions inhibitrices de la réplication virale du facteur de restriction TRIM5 α en interagissant avec le même site riche en proline de la capsidie [Luban et al., 2012 ; Zhou et al., 2012].

Récemment, il a été montré que le domaine NC était également capable de recruter Tsg101 et ainsi le complexe ESCRT-I via ses doigts de zinc [Chamontin et al., 2015]. Ce recrutement permettrait notamment de prévenir une reverse transcription précoce et la formation de particules virales contenant de l'ADN [Chamontin et al., 2015]. Ces travaux viennent confirmer les travaux de Dussupt et al., qui ont montré en 2009 que la NC jouait un rôle coopératif avec la région PTAP de p6 pour le recrutement du complexe ESCRT nécessaire au bourgeonnement viral. Notamment, ils ont montré que le domaine Bro1 de la protéine ALIX interagissait avec Gag via le domaine NC [Dussupt et al., 2009]. Leurs travaux mettent en évidence également qu'il est possible de retrouver une production virale en sur-exprimant Bro1 dans des cellules exprimant Gag dont les domaines tardifs ont été délétés [Dussupt et al., 2009].

Il semble cependant que tous les facteurs cellulaires nécessaires à l'assemblage viral n'ont pas été mis en évidence. L'assemblage viral est un processus complexe, orchestré par la protéine Gag qui utilise le matériel viral et cellulaire à disposition pour favoriser la formation d'une particule virale, et ainsi la propagation du virus dans l'hôte (tableau 2). Mais il reste encore de nombreuses boîtes noires à élucider avant de pouvoir comprendre parfaitement ce processus. De nombreuses équipes s'attachent à découvrir ainsi les éléments et étapes nécessaires à la formation du VIH-1, dans l'espoir qu'un jour ces travaux puissent servir à trouver le moyen de guérir de cette infection.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 30 : Spectre électromagnétique de la lumière. UV : ultra-violets, IR : infra-rouge. Les longueurs d'ondes du spectre visible, représentés en bas de la figure, sont notées en mètres.

Source : adapté de : outils pédagogiques en ligne de l'Université de Laval, Québec : <http://www.fsg.ulaval.ca/opus/>

Chapitre 2. La nanoscopie dynamique

1. De la microscopie à la nanoscopie

Les premières observations scientifiques documentées à l'aide d'un microscope sont associées à Robert Hooke (1635-1703) et Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723). Le premier était un savant anglais largement reconnu pour sa contribution sur les propriétés des cristaux et la composition de la lumière. Il réalisa de nombreuses observations du monde vivant, et il est le premier à utiliser le terme de « cellule » dans son ouvrage *Micrographia or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses* en 1665. Depuis, la résolution optique des microscopes n'a eu de cesse d'être améliorée, aboutissant dans les années 1950 aux premiers microscopes électroniques, permettant d'observer les structures fines à l'intérieur des cellules.

Le XXème siècle a connu une révolution concernant le monde de la microscopie, avec la découverte de la GFP (*green fluorescent protein*), une protéine fluorescente issue de la méduse, isolée et caractérisée par Osama Shimomura en 1962 [Shimomura et al., 1962]. Le prix Nobel de Chimie a d'ailleurs été décerné en 2008 aux chercheurs Osama Shimomura, Roger Tsien et Martin Chalfie pour leurs travaux sur la protéine fluorescente GFP. Cette découverte, et son utilisation dans les organismes vivants comme marqueur biologique a marqué un tournant majeur dans la recherche en Biologie. Du fait de sa grande sensibilité ainsi que de sa spécificité, la fluorescence est devenue un outil incontournable en Biologie. Aujourd'hui, de nombreuses protéines fluorescentes, seules ou fusionnées à d'autres protéines permettent ainsi d'observer et de suivre la dynamique de processus biologiques spécifiques.

2. La microscopie de fluorescence

2.1. La lumière

La lumière est une forme d'énergie caractérisée par ses propriétés ondulatoires et corpusculaires. La microscopie photonique utilise les radiations électromagnétiques du spectre visible de la lumière pour éclairer l'échantillon. La lumière se comporte comme une onde électromagnétique, dont les vibrations dans le champ sont périodiques et avec une fréquence spécifique. Chaque couleur du spectre visible correspond à une longueur d'onde déterminée comprise entre 400 et 700nm (figure 30). La lumière est composée de particules, appelées photons, caractérisées par leurs énergies. L'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de l'onde lumineuse qu'il compose : $E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$, où E est l'énergie du photon, h la constante de Planck ($=6,63 \cdot 10^{-34}$ J/s), c la célérité de la lumière ($=3 \cdot 10^8$ m/s), λ est la longueur d'onde, et ν est la fréquence de l'onde.

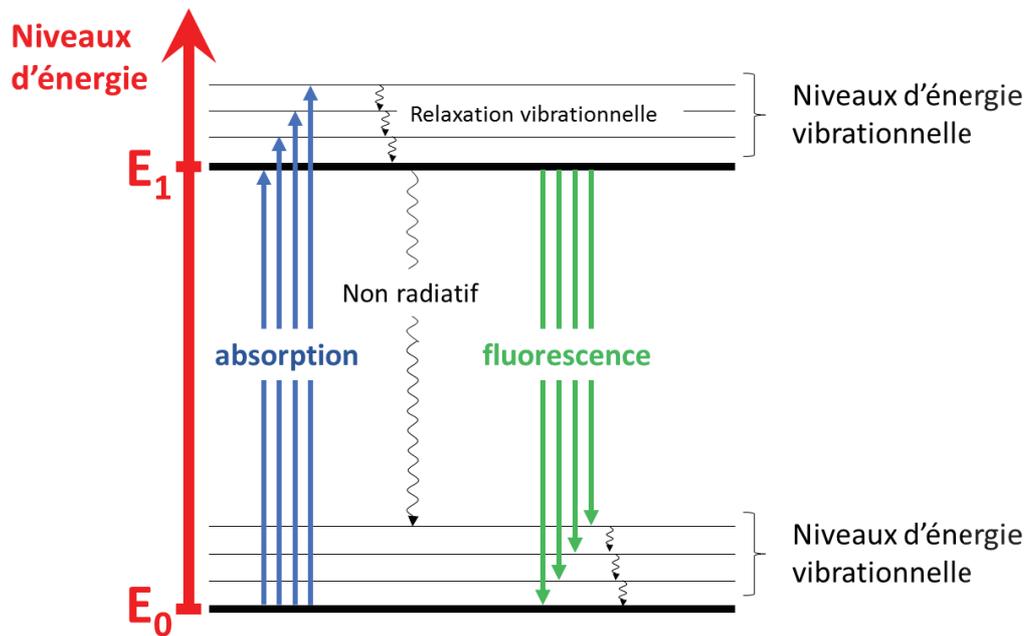


Figure 31: Diagramme simplifié de Jablonski. E_0 correspond à l'état électronique fondamental, E_1 à l'état électronique excité. Les sous-niveaux énergétiques sont représentés par des traits moins épais.



Figure 32: Spectres d'émission et d'excitation de la protéine mEOS2. Les spectres d'excitation sont représentés en pointillés, et les spectres d'émission sont représentés en trait plein. Le clivage protéique induit par l'absorption de l'énergie à 405nm est représenté de chaque côté du spectre.

2.2. La fluorescence

La fluorescence est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse. A température ambiante, les électrons ont un niveau d'énergie minimum, appelé état fondamental E_0 . La molécule peut passer de son état stable E_0 à un état excité supérieur E_1 ou E_2 , après absorption d'énergie radiative, chacun de ces états ayant des niveaux énergétiques et vibrationnels différents. Après un certain temps, l'électron quitte l'état excité pour retrouver son état fondamental. Soit ce retour se fait directement vers l'état fondamental E_0 avec l'émission d'un photon dont l'énergie est plus basse que l'énergie d'excitation, on observe alors la fluorescence. Soit ce retour se fait par étapes successives via un processus non radiatif. Ces transitions énergétiques sont représentées dans le Diagramme de Jablonski (figure 31).

Chaque molécule fluorescente est caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission montrant la distribution des probabilités de transition énergétique. Chaque fluorophore possède des spectres qui lui sont propres, caractéristiques de la structure des molécules. Comme l'énergie émise est inférieure à l'énergie excitatrice, la longueur d'onde du maximum d'émission λ_{em} est supérieure (donc d'énergie plus faible) à la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} (de plus haute énergie). La distance entre les maxima d'excitation et d'émission est appelée le décalage de Stokes.

2.3. Les protéines photo-convertibles : exemple de la protéine mEOS2

2.3.1. Les sondes photo-convertibles

Les protéines photo-convertibles sont des fluorophores qui ont la capacité de changer d'état fluorescent (changement des spectres d'émission/excitation) après activation par un stimulus lumineux. Il existe des protéines photo-convertibles à l'état naturel, telle que la protéine EosFP issue des coraux rocheux *Lobophyllia hemprichii* [Wiedenmann et al., 2004].

2.3.2. Structure de la mEOS2

La protéine mEOS2, à l'instar de la GFP, est repliée en un tonneau β . Le site fluorescent est constitué de 3 acides aminés caractéristiques des fluorophores photoconvertibles His-Tyr-Gly [Wiedenmann et al., 2004]. La protéine mEOS2 est dérivée de la protéine EosFP. Elle a été modifiée pour être monomérique et permettre son expression à 37°C [McKinney et al., 2009].

2.3.3. Les spectres d'excitation et d'émission

La protéine mEOS2 émet de manière basale dans le vert avec $\lambda_{em}^{vert} = 519nm$ après excitation à $\lambda_{exc}^{vert} = 506nm$. Après activation par un rayon du proche UV ($\lambda_{activation} = 405nm$), la chaîne peptidique dont est issue le fluorophore est clivée, ce qui induit un changement des spectres d'émission et d'excitation, avec une émission dans le rouge $\lambda_{em}^{rouge} = 584nm$ suite à une excitation $\lambda_{exc}^{rouge} = 573nm$ (figure 32) [Mizuno et al., 2003]. Le temps de photo-conversion

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 33: Schéma de la diffraction de la lumière. Le faisceau lumineux (en rouge), de longueur d'onde λ passe par une fente sphérique de diamètre d . L'image de la source lumineuse est formée d'une alternance de bandes concentriques claires et noires, centrées autour d'une tache claire. source: cours de M2 Informatique - Imagerie 2010 par Dr. Philippe Guillaud - UPMC

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 34: Représentation des disques d'Airy formés par la diffraction de la lumière et de la fonction d'étalement du point (PSF point spread function) associée. Source : cours d'optique – université Sophia Antipolis par Eric Aristidi

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 35: Critère de Rayleigh et pouvoir séparateur du système optique. Le critère de Rayleigh est défini par l'équation $\theta = 1.22\lambda/D$ où θ = séparation angulaire limite (en radians), λ = longueur d'onde de la lumière émise, D = diamètre de la fente circulaire (critère inhérent au microscope). Si la séparation angulaire limite est supérieure ou égale au critère de Rayleigh, alors les deux points lumineux seront résolus, si la séparation angulaire limite est inférieure au critère de Rayleigh, alors les objets ne pourront pas être séparés et seront considérés comme un seul objet.

Source : cours d'optique de l'université Sophia Antipolis par Eric Aristidi

suit une distribution décroissante exponentielle. De ce fait, toutes les protéines ne se convertissent pas en même temps [Mizuno et al., 2003]. C'est cette propriété particulière qui est utilisée pour réaliser la microscopie de localisations PALM.

2.4. La résolution : enjeu majeur de la microscopie

La résolution d'un système optique est définie comme la plus petite distance permettant de distinguer deux points comme étant deux entités séparées. La résolution d'un système optique en champ lointain est limitée par la diffraction. La diffraction est une conséquence des interférences constructives et destructives d'une onde lumineuse avec elle-même qui peuvent se produire lorsque cette onde se déphase. Les sources de déphasages sont nombreuses et la différence de chemin optique peut en être une. Par exemple, lorsqu'une onde traverse une fente circulaire, elle donne naissance à des franges de diffraction (figure 33) qui sont la conséquence de la transformation d'une onde plane (avant la fente) en une onde sphérique (après la fente). La position, la largeur ainsi que la distance entre chacune des tâches de diffraction sont très bien connues dans le cas d'ondes monochromatiques et se calculent à l'aide d'une fonction de Bessel.

Lorsque la fente sphérique devient infiniment petite, les tâches de diffractions obtenues pourront donc être apparentées à la diffraction d'un point source (i.e., dont la taille est très petite par rapport à la longueur d'onde). L'allure de cette tâche de diffraction est nommée fonction de dispersion optique ou PSF (pour *Point Spread Function*). De ce fait, une molécule unique qui émet de la fluorescence apparaîtra comme une tache lumineuse d'environ 100 fois la taille de la molécule elle-même [Manley et al., 2010]. Cette tache est appelée disque d'Airy (figure 34).

Par définition, la résolution correspond à la distance entre le maximum de la fonction de Bessel d'un premier émetteur et le premier minimum de la fonction de Bessel d'un second émetteur : c'est le critère de Rayleigh (figure 35). Autrement dit, on considère que les images de deux points lumineux sont distinctes si la distance qui les sépare est au moins égale à la demi-largeur de la tâche d'Airy. Dans un microscope, cette distance vaut

$$d = \frac{0.6 \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}$$

avec λ la longueur d'onde de la lumière émise, n l'indice de réfraction du système et α l'angle maximum avec lequel les ondes peuvent pénétrer dans l'objectif. Le critère $n \cdot \sin(\alpha)$ correspond à l'ouverture numérique de l'objectif. Plus la limite de résolution est petite, plus le pouvoir séparateur du microscope est grand.

Le pouvoir séparateur d'un microscope est donc fonction de trois paramètres principaux: la longueur d'onde λ utilisée, l'indice de réfraction n du milieu qui sépare l'échantillon de l'objectif, et l'objectif lui-même (tableau 3). Ainsi, la meilleure résolution théorique que l'on peut atteindre avec un objectif d'ouverture numérique 1.4 dans un microscope optique classique est de

Objectif plan apochromatique

En considérant que l'indice de réfraction est continue entre l'objectif et l'échantillon

Grossissement	Ouverture numérique	Résolution en xy (nm)
4x	0.20	1 375
10x	0.45	610
20x	0.75	370
40x	0.95	290
60x	0.95	290
100x	1.40	200

Tableau 3 : résolution spatiale en xy théorique obtenue en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Ces valeurs considèrent un indice de réfraction continue entre l'objectif et l'échantillon avec un objectif plan apochromatique.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 36: Schéma du principe d'illumination par microscopie TIRF

Source : cours de microscopie optique au département de physique de l'ENS par Maxime Dahan,

200nm. Cette taille est nettement supérieure à la taille des molécules.

3. La nanoscopie dynamique : focus sur le spt-PALM

La nanoscopie de fluorescence regroupe les méthodes d'imagerie qui permettent de s'affranchir de la limite de diffraction des microscopes classiques. Parmi ces méthodes, on compte des méthodes basées sur la photophysique des molécules comme le STED (*Stimulated Emission Depletion*), qui consiste à réduire la taille de la tâche d'excitation autour de son centre en forçant le retour à l'état fondamental des fluorophores excités à l'aide d'un faisceau de déplétion, avant que ceux-ci n'émettent de photon [Hell et al., 1994], et d'autres méthodes basées sur la photochimie des molécules comme le PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*) [Betzig et al., 2006] ou le STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [Rust et al., 2006] qui consistent à activer les molécules fluorescentes une par une afin d'éviter de se retrouver dans une configuration où deux molécules situées à une distance inférieure à la résolution émettent simultanément.

3.1. Le principe du spt-PALM

Le spt-PALM (*single particle tracking PALM*) est une méthode de microscopie de super-résolution dynamique faisant appel à des techniques de microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM *single molecule localization microscopy*) qui reposent sur l'activation stochastique et transitoire de molécules fluorescentes comme la mEOS2 [Manley et al., 2008 ; Sibarita et al., 2014]. Elle permet de suivre simultanément le déplacement de multiples molécules uniques. En effet, l'émission des protéines activées est restreinte dans le temps: elles sont photoblanchies au bout d'un temps moyen qui est caractéristique du fluorophore et de l'environnement dans lequel se situe le fluorophore.

Afin de déchiffrer l'assemblage viral à l'échelle de la molécule unique, nous avons utilisé cette approche de sptPALM. Le VIH-1 est connu pour s'assembler majoritairement à la membrane plasmique des cellules hôtes [Hermida-Matsumoto et al., 2000 ; Jouvenet et al., 2006 ; Ono, 2009 et 2010], nous avons couplé cette approche à une microscopie par illumination TIRF (*Total internal Reflection Fluorescence*).

3.1.1. La microscopie par illumination TIRF

Selon la loi de Snell-Descartes ($n_1 \cdot \sin(i_1) = n_2 \cdot \sin(i_2)$) une réflexion totale d'un faisceau lumineux peut se produire lorsque ce dernier frappe une interface (un dioptre) entre deux milieux d'indices différents avec un angle supérieur à l'angle critique de réfraction.

De façon simplifiée, lorsque cette réflexion totale se produit dans une interface d'épaisseur non nulle (telle que la lame de verre), cette interface se conduit alors comme un guide d'onde (comme une fibre optique par exemple) et une onde évanescente est créée à l'interface des



Figure 37: Principe du PALM. A. et B. Un sous-ensemble éparé de molécules fluorescentes photo-activables fusionnées aux protéines d'intérêt sont activées avec une impulsion laser à 405nm et imagées à 561nm jusqu'à ce que les molécules fluorescentes soient photoblanchies. C. et D. Ce processus est répété de nombreuses fois jusqu'à ce que la population de molécules inactivées soit très faible. E. et F. La somme de toutes les images ainsi obtenues entraîne la formation d'une image limitée par la diffraction de la lumière. G. Cependant, si la localisation de chaque molécule est déterminée en ajustant l'image du fluorophore (G. image de gauche) par la fonction d'étalement du point (G, image centrale), l'image de la molécule peut être associée à une fonction gaussienne et localisée avec une précision de pointée supérieure (G, image de droite). A'-D'. Ce processus de localisation est répété à chaque image de chaque molécule fluorescente. E' et F'. La somme de ces localisations permet d'obtenir une image de super-résolution, dont la résolution est fonction de l'ajustement gaussien et de la densité de molécules activées par image. Echelle : 4µm x 4µm sauf pour F et F' 1µm x 1µm
Source: Betzig et al., 2006.

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 38: A. Localisation d'une particule fluorescente grâce à l'ajustement gaussien. L'image de la molécule est représentée par une tache d'Airy. Cette intensité de fluorescence dans le plan peut être approximée et ajustée par une gaussienne dont le centre correspond à la position de la molécule. Le panel haut de l'image est issu de Betzig et al. 2006. **B. Différence entre précision de pointée et pouvoir séparateur.** Le pouvoir de séparation, ou résolution, dépend de la longueur d'onde utilisée et de l'ouverture numérique de l'objectif ($0.61\lambda/NA$). Autrement dit, il est impossible de distinguer 2 objets s'ils ne sont pas distants d'au moins la valeur du pouvoir de séparation. La précision de pointée correspond à la capacité à localiser un objet à partir de la connaissance de la tâche d'Airy. Cela ne sera possible de manière précise que si la molécule observée est isolée.

deux milieux. Grâce à une décroissance exponentielle de l'intensité de cette onde évanescente, la microscopie TIRF limite la profondeur d'excitation de l'échantillon à une centaine de nanomètres au-dessus de l'interface verre/cellule (figure 36). [Axelrod et al., 1989 ; Tokunaga et al., 1997]. De ce fait, cette technique permet d'exciter majoritairement les molécules fluorescentes à proximité de la membrane plasmique adhérente à la surface de la lamelle de verre.

3.1.2. L'acquisition

Pour réaliser correctement une expérience de spt-PALM et/ou de PALM, il est ainsi nécessaire de maîtriser la densité de molécules activées à un temps t afin de s'assurer que, statistiquement, un seul marqueur soit photo-converti dans une surface correspondant à la taille de un (PALM) ou plusieurs (spt-PALM) disques d'Airy. Ceci est réalisé en utilisant une intensité d'illumination constante à la longueur d'onde d'excitation (561nm, avec une puissance de l'ordre du mW/cm^2), et en ajustant l'intensité d'activation (405nm, avec une puissance de l'ordre du $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) pour maintenir une densité restreinte de molécules. Pour chaque image, on obtient donc un ensemble épars de protéines activées, qui sont ensuite photoblanchies. L'image qui la succède permet d'activer d'autres protéines mais conserve aussi les protéines non photoblanchies. Ce processus est répété jusqu'à ce que toutes les molécules aient été activées, nous permettant d'obtenir soit une pile d'images à partir desquelles chaque protéine fixée fluorescente est localisée (figure 37) [Betzig et al., 2006], soit d'obtenir des trajectoires issues des localisations successives enregistrées.

3.1.3. La localisation

Afin de bénéficier totalement des avantages du PALM en termes de résolution ou plus exactement de précision, il faut localiser chaque émetteur (molécule) qui donne naissance à un signal.

La localisation par ajustement gaussien

Chaque image d'un émetteur ponctuel est donnée par la fonction de dispersion optique (PSF=*Point Spread Function*) qui reflète la distribution spatiale des photons émis par la molécule dans le plan image. Cette distribution (fonction de Bessel) est très bien approximée par une gaussienne. De ce fait, la position de chaque molécule peut être déterminée en ajustant cette distribution spatiale par une gaussienne dont le maximum correspond au centre de la molécule (figure 38). L'ajustement Gaussien permet de retrouver la position de la molécule fluorescente avec une précision de pointée de l'ordre de la dizaine de nanomètres, en fonction du rapport signal sur bruit de l'image. La précision de pointée est dépendante du nombre de photons émis : plus il y a de photons émis, meilleure est la précision de pointée (précision de pointé $\sigma \propto \frac{1}{\sqrt{N}}$ avec N , le nombre de photons récoltés par molécule localisée, σ correspond à la

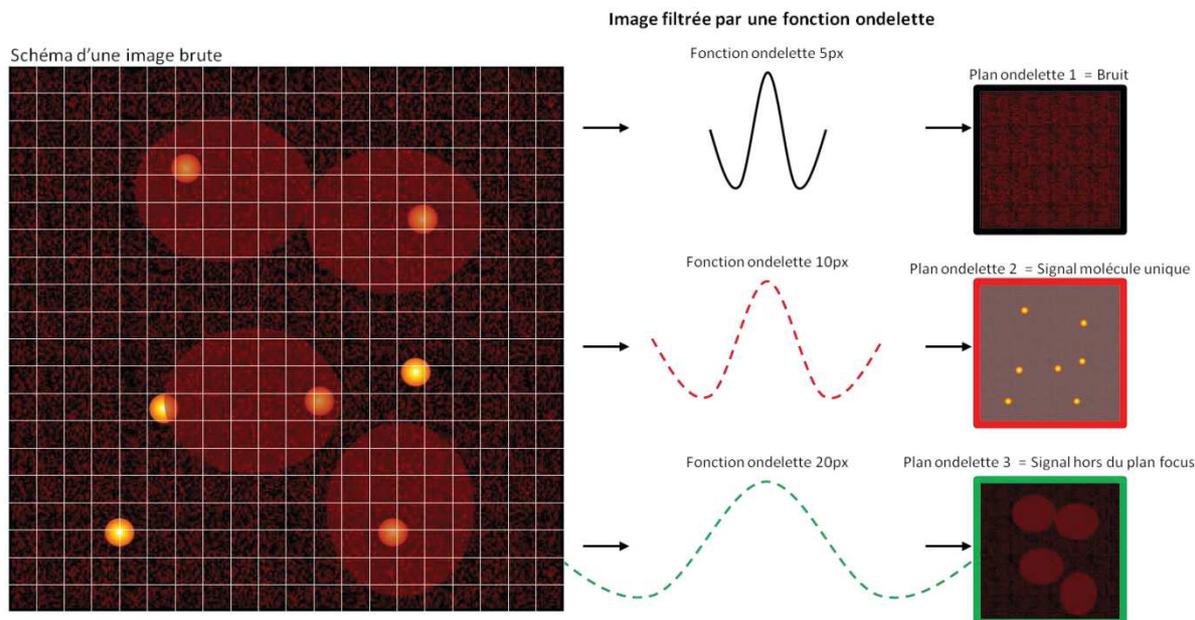


Figure 39: Localisation par ondelette. L'image brute (à gauche) obtenue est composée de 3 types majeurs d'information: le bruit, qui est un signal haute fréquence, le signal des molécules fluorescentes (représenté par les billes jaunes) et le bruit de fond (représenté par des ovals rouges clairs) qui correspond au signal en dehors du plan focus. La décomposition par ondelettes permet de distinguer ces 3 types d'informations. L'image brute est filtrée par 3 fonctions ondelettes de différentes tailles : 5 pixels (panel du centre, ondelette noire), 10 pixels (panel du centre, ondelette rouge) et 20 pixels (panel du centre, ondelette verte). Dans le cas de la détection de particules uniques, les ondelettes utilisées sont celles pour les objets isotropes, c'est-à-dire qui présentent les mêmes caractéristiques dans toutes les directions de l'espace. L'image brute est ensuite soustraite par les images filtrées individuellement permettant d'obtenir différents plans ondelettes : le plan ondelette 1 extrait le bruit (panel de droite, image du haut), le plan ondelette 2 permet d'extraire le signal des molécules activées (panel de gauche, image du milieu) et le plan ondelette 3 permet d'extraire le bruit de fond (panel de gauche, image du bas). Le plan ondelette 2 sera utilisé pour localiser le barycentre de chaque signal.

largeur de la gaussienne et donc à la précision de pointée).

La localisation par ondelettes

L'image brute est une matrice de pixels (picture cell) dont la taille varie en fonction des choix de l'acquisition (512x512, 1024x1024...). Cette image contient différents types d'informations (i.e. signal) spatialement réparties :

- Le signal émis par les objets fluorescents : c'est un signal de haute fréquence spatiale (qui se produit souvent dans l'espace). Il contient les détails de l'image et est donc celui qui nous intéresse.
- Le bruit intrinsèque à l'image, qui correspond à un signal basse de fréquence spatiale. Les détails sont presque inexistant : il correspond souvent au signal situé en dehors du plan focus (communément appelé «bruit de fond»).
- Le bruit d'acquisition et ou de lecture: même en l'absence de signal, la lecture de la caméra peut générer un bruit de façon aléatoire induisant un signal à haute fréquence spatiale indépendant du système optique.

Une approche développée récemment [Izzedin et al., 2012] permet de convoluer¹ l'image par des ondelettes (ondes de fréquence spatiale choisie) filtrant ainsi cette dernière. En effet, chaque longueur d'onde spatiale (i.e taille de la fonction ondelette) va essentiellement extraire les objets de longueur d'onde équivalente (figure 39). Ceci permet ainsi d'augmenter le contraste, mettant en évidence plusieurs niveaux de détails de l'image : le bruit (plan ondelette 1), le signal des molécules fluorescentes (plan ondelette 2) et le bruit de fond (plan ondelette 3). Une fois identifié, le plan correspondant majoritairement au signal des molécules fluorescentes est seuillé en intensité, permettant ainsi la création d'un masque spatial. A partir de ce masque, il est possible de localiser les protéines uniques en utilisant le centroïde spatial du signal. [Izzedin et al., 2012].

La décomposition par ondelettes présente des avantages importants : d'une part le temps de calcul est 20 fois plus rapide que la localisation par ajustement Gaussien, même si la précision est diminuée de 10% (précision de localisation de 40-50nm). Par ailleurs, comme la localisation est indépendante du bruit (plan ondelette différent), il est possible de détecter des molécules même si le rapport signal sur bruit est faible [Izzedin et al., 2012]. En revanche, ce type de localisation est basé sur la détection du centroïde d'une image masquée. Toutes les informations du signal sont perdues (représenté par les paramètres de la Gaussienne : hauteur, largeur etc.).

¹ convolution : traitement d'une matrice par une autre. L'image brute est considérée comme une matrice dont la taille est donnée par le nombre de pixels. Une "matrice de convolution", ici définie par la fonction ondelette, est utilisée pour filtrer la matrice image : chaque pixel de l'image est étudié successivement par la matrice de convolution (plus petite que la matrice image) et traitée pour en extraire les informations correspondant à la taille de la fonction ondelette utilisée.

A

Image soumise aux droits d'auteur

Figure. 40: A. Principe d'acquisition (A) Les données brutes sont acquises sous activation et excitation continue. L'acquisition d'images pour une molécule est réalisée jusqu'à son photo-blanchiment, il est donc limité dans le temps, puis l'image de chaque molécule est localisée pour obtenir une position nanométrique. **B. Principe de la reconstruction des trajectoires par suivi de protéine unique**, (B). Les positions moléculaires des clichés successifs sont associées, en se basant sur un coefficient de diffusion maximum autorisé, permettant de reconstruire la trajectoire des protéines individuelles. *Source: adapté de Manley et al., 2010*

Pour finir, il est possible de coupler les deux méthodes de localisation en réalisant une première approximation de la localisation spatiale des molécules par la décomposition par ondelette, puis en réalisant un ajustement gaussien au niveau des positions x,y détectées

3.2. La reconstruction des trajectoires : le sptPALM

La localisation des molécules fluorescentes par PALM permet d'examiner la distribution spatiale de ces protéines. Cependant, il est possible de coupler le PALM au suivi des protéines uniques, apportant des informations dynamiques des molécules individuelles. En effet, la rapidité d'acquisition des images nous permet de suivre les positions de chaque molécule dans le temps, et de reconstruire ainsi leur trajectoire en connectant chaque localisation jusqu'au photoblanchiment du fluorophore (figure 40). Les trajectoires peuvent être reconstruites en reliant les localisations de chaque molécule dans des images consécutives selon leur proximité [Manley et al., 2008]. La difficulté inhérente au spt-PALM est due à la présence simultanée de plusieurs molécules à suivre. Ce problème a déjà été résolu en partie [Sergé et al., 2008].

3.3. L'analyse des données sptPALM

3.3.1. Le déplacement quadratique moyen (MSD)

Les trajectoires reconstruites sont généralement analysées pour décrire les différents types de mouvements. Ces mouvements donnent des informations quant à l'environnement et les interactions qui sont imposées à la protéine d'intérêt.

L'analyse commune des trajectoires en sptPALM consiste à déterminer le déplacement quadratique moyen (MSD) des molécules fluorescentes. Le MSD décrit la moyenne des distances carrées entre le point de départ d'une protéine et sa position finale pour chaque décalage temporel Δt d'une durée donnée au sein de chaque trajectoire reconstruite (figure 41.b). Cependant, en augmentant le décalage temporel Δt , de moins en moins de points de trajectoire sont considérés, augmentant ainsi l'incertitude des valeurs de la MSD [Qian et al., 1997]. Il est donc généralement proposé de calculer la MSD à partir de décalages temporels prenant en compte moins d'1/4 du nombre total de point de la trajectoire [Saxton et al., 1997]. De cette contrainte analytique, découle ainsi une autre contrainte : les trajectoires analysées doivent présenter un nombre de points suffisants pour réaliser le calcul de la MSD (les trajectoires doivent donc être relativement longues), et l'axe temporel de la représentation de la MSD ne représente qu'une fraction de l'échelle temporelle totale de la trajectoire [Ruthard et al., 2011]. Malgré cela, à partir de la représentation MSD(t), on obtient des informations concernant le mode de déplacement des protéines suivies, et on peut ainsi en déduire ainsi les différents types de mouvements des protéines [Saxton et al., 1997].

Figure 41: Suivi de protéines uniques et déplacement quadratique moyen (MSD). **A.** Localisation du signal d'une molécule unique grâce à un ajustement gaussien 2D (équation de l'ajustement sous la figure) : les coordonnées en x,y de la particule au temps t. **B. MSD plot.** Panel du haut : schéma des trajectoires montrant la distance parcourue entre 2 images (chaque localisation à chaque image est représentée par un cercle bleu). La moyenne de la distance carré de chaque pas au sein de la trajectoire et pour chaque intervalle de temps Δt donne un point du plot de la MSD (avec $\Delta t_1 = \tau$ - rouge, $\Delta t_2 = 2\tau$ - vert foncé, $\Delta t_3 = 3\tau$ - vert clair etc... jusqu'à la fin de la trajectoire (sachant que $\tau =$ intervalle de temps entre chaque image) **C. L'étude de la MSD en fonction du temps permet de classer les différents comportements diffusif des protéines étudiées.**

Une fonction linéaire indique une diffusion normale et peut être décrite par $\langle r^2 \rangle = 4D \cdot \Delta t$ pour une analyse en 2 dimensions (D=coefficient de diffusion).

Une fonction quadratique indique un mouvement dirigé et peut être décrite par $\langle r^2 \rangle = v^2 \Delta t^2 + 4D \Delta t$ (v=vélocité moyenne de la protéine).

Quand la MSD approche un maximum de manière asymptotique plus grand que Δt , le système subit une diffusion confinée ou du moins contrainte,

décrite par $\langle r^2 \rangle = \langle r^2_c \rangle (1 - A_1 e^{\frac{-4A_2 D \Delta t}{\langle r^2_c \rangle}})$

Une diffusion anormale est décrite par $\langle r^2 \rangle = 4D \Delta t^\alpha$ ($\alpha < 1$: subdiffusion)

Source: Ruthard et al., 2011

3.3.2. Les différents types de mouvements

Si elle n'est soumise à aucune contrainte physique, la molécule diffuse librement dans le milieu : on dit alors qu'elle présente un mouvement Brownien, c'est-à-dire un mouvement aléatoire et désordonné des molécules dans l'espace. Ces mouvements résultent des impulsions transmises à la molécule par les molécules du milieu, soumises à l'agitation thermique. Si le mouvement Brownien explique très bien le comportement des molécules dans des milieux dilués, il est fort probable qu'il soit différent dans des environnements de type cellulaire. La déviation au comportement Brownien peut être issue de plusieurs causes : les interactions moléculaires transitoires, le transport, le confinement spatial... Suivant le type de mouvement considéré, la MSD en fonction du temps prendra une expression analytique différente. (figure 41 C).

Différentes grandeurs peuvent être extraites de la représentation MSD(t). Dans le cas de protéines présentant une diffusion normale ou anormale, il est par exemple possible d'extraire un coefficient de diffusion D_{coef} (figure 40c) selon l'équation :

$$\langle r^2 \rangle = 4D \cdot \Delta t^\alpha,$$

où $\alpha=1$ dans le cas d'une diffusion Brownienne (en rouge dans la figure 41.c), et $\alpha<1$ (subdiffusion) dans le cas d'une diffusion anormal (en violet dans la figure 41.c).

L'étude des coefficients de diffusions apporte des informations précieuses quant à la dynamique des protéines d'intérêt. L'avantage du sptPALM réside dans le grand nombre de trajectoires, et donc de D_{coef} qui peuvent être déterminés, dans une seule cellule. Le sptPALM permet donc de recréer une cartographie des D_{coef} de molécules uniques. Cette carte, qui reflète l'environnement spatial perçu par la molécule, permettra par exemple de localiser l'association de protéines en domaines définis.

3.3.3. L'analyse par Inférence Bayésienne du suivi de protéines uniques

Les informations obtenues à partir de l'analyse des coefficients de diffusions extraits d'un ajustement linéaire du déplacement quadratique moyen (MSD) sont parfois insuffisantes pour comprendre les mécanismes moléculaires en jeu dans une cellule. En effet, cette approche considère les molécules suivies comme diffusives. Les déviations du profil de diffusion Brownien observées sont alors interprétées comme étant dues à différentes contraintes imposées aux protéines (biologiquement, ces contraintes peuvent être par exemple la densité du réseau du cytosquelette, ou à la liaison de la protéine d'intérêt avec un moteur moléculaire...).

Une nouvelle méthode d'analyse des données d'acquisition en sptPALM permet de décrire certains paramètres qui influencent le mouvement des protéines membranaires. En se basant sur le principe de l'inférence Bayésienne (figure 42) [Turckan et al., 2012], cette méthode

Image soumise aux droits d'auteur

Figure 42 : Représentation schématique de l'approche d'inférence Bayésienne. La loi de Bayes établit que la distribution *a posteriori* $P(Q|T)$ est égale au produit de la *vraisemblance* (likelihood) $P(T|Q)$ par le *prior* $P_0(Q)$ divisé par la preuve $P_0(T)$.

Où Q est l'état des protéines étudiées (diffusivité D , énergie potentielle E de la protéine, champ de force F dans lequel la protéine évolue), et T est la trajectoire étudiée, c'est une donnée connue.

Ainsi, la distribution *a posteriori* $P(Q|T)$ correspond à la probabilité que la protéine considérée soit à l'état Q , en considérant sa trajectoire T donnée. Le *prior* $P_0(Q)$ correspond à la probabilité d'observer l'état Q dans notre système (ou le degré de croyance initial de l'hypothèse que Q existe); cette fonction prend en compte les paramètres d'acquisition et la photo-physique du fluorophore utilisé. La *preuve* $P_0(T)$ correspond à la probabilité d'avoir une trajectoire T dans notre système.

La fonction de vraisemblance $P(T|Q)$ correspond à la probabilité d'observer la trajectoire T en considérant l'état Q . Elle est définie au sein de la flèche : la fonction de vraisemblance est égale au produit des probabilités de transition $P(r_2, t_2 | r_1, t_1)$ pour la trajectoire complète. Le pic de la distribution des probabilités *a posteriori* $P(Q|T)$ (figure de droite, en orange) donne la valeur la plus probable, c'est-à-dire la plus vraisemblable, de la variable Q , et la largeur du pic représente l'incertitude des valeurs inférées.

source: *Türkan et al., 2012*

Equation de Langevin :

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{\nabla E(r)}{\gamma(r)} + \sqrt{2D(r)} \xi(t)$$

Energie potentielle

Viscosité locale

Diffusivité

Figure 43: Description du mouvement des protéines par l'équation de Langevin. Le mouvement des protéines est régi par les interactions moléculaires décrites par l'énergie potentielle $E(r)$ (en orange), et la diffusivité $D(r)$ (en bleu). Le *nabla* ∇ représente le gradient de la fonction $E(r)$, c'est à dire les variations de l'énergie potentielle dans l'espace r considéré. [adapté de *Masson et al., 2014*]

présume que l'environnement membranaire est caractérisé par deux grandeurs spatialement variables : la diffusivité D , et l'énergie potentielle E . Dans ce contexte, la protéine est associée à un marcheur aléatoire dont le mouvement est régi par l'équation de Langevin (figure 43) [Masson et al., 2014].

Cette méthode nous permet ainsi d'extraire des paramètres relatifs à l'état de chaque protéine suivie par sptPALM, en prenant en compte l'impact de l'environnement membranaire sur la dynamique des protéines, tels que :

- la **diffusivité des protéines D** , qui correspond au coefficient de diffusion des protéines
- la **force \vec{F}** , qui permet de déterminer les effets dynamiques qui agissent sur les protéines. C'est un vecteur dont le sens et la direction indiquent l'orientation du mouvement des protéines et dont la magnitude de la force permet de quantifier ces effets (norme du vecteur).
- l'**énergie potentielle E** , qui correspond à l'énergie que possède un corps en vertu de son emplacement dans un champ de force. L'énergie potentielle permet d'identifier des domaines où ces protéines sont soit piégées (puits énergétique), soit exclues (barrière énergétique).

Nous verrons un exemple d'utilisation de cette méthode d'analyse dans la dernière partie de la présentation de mes résultats de thèse. Nous reviendrons alors plus en détails sur les différents paramètres extraits et leur signification.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'assemblage viral est un processus majeur dans la formation de nouvelles particules virales qui a été largement étudié grâce à des approches biochimiques [Freed E.O, 2015]. Cependant, ce processus est hautement dynamique. Il est donc primordial de comprendre la relation complexe qui existe entre la mobilité des acteurs viraux et cellulaires, leur stœchiométrie et leurs interactions au cours de ce processus. La protéine Gag est un acteur majeur dans la formation de nouvelles particules virales, puisqu'elle peut induire, seule, la formation de VLPs [Gheysen et al., 1989 ; Campbell et al., 2001].

L'objectif de ma thèse était donc de comprendre la dynamique d'assemblage de la protéine Gag à la membrane plasmique des lymphocytes T, cellules cibles du VIH-1, par microscopie de super-résolution dynamique: le sptPALM. Cette approche technique nous permet non seulement d'avoir accès à la distribution spatiale de Gag à la membrane avec une résolution spatiale inférieure à la taille d'un virion mais nous permet surtout d'observer la dynamique en temps réel des protéines Gag à l'échelle de la protéine unique en cellule vivante. L'assemblage viral est un processus situé au niveau de la membrane plasmique [Hermida-Matsumoto et al., 2000 ; Jouvenet et al., 2006 ; Ono et al., 2009]. La microscopie sptPALM a donc été couplée à l'illumination TIRF afin d'imager les protéines Gag situées à proximité de la membrane plasmique.

Ainsi, grâce au sptPALM/TIRF, nous pourrions décrire la signature dynamique de la protéine Gag à la membrane d'une cellule d'une part, et au cours d'un processus d'assemblage en suivant la formation d'une plateforme d'assemblage d'autre part. Les interactions moléculaires étant primordiales dans ce processus, la dynamique de mutants d'assemblage de Gag et l'analyse de la déviation de leur signature dynamique par rapport au Gag sauvage, nous permettront d'étudier l'impact des domaines de Gag dans l'aboutissement du processus d'assemblage. Pour finir, de nouvelles approches mathématiques nous permettront de cartographier les énergies d'interaction moléculaire de Gag qui interviennent au cours de l'assemblage.

RESULTATS & CONCLUSIONS

L'étude de la nano-organisation dynamique de la protéine Gag du VIH-1 à la membrane plasmique des cellules T CD4+ par sptPALM

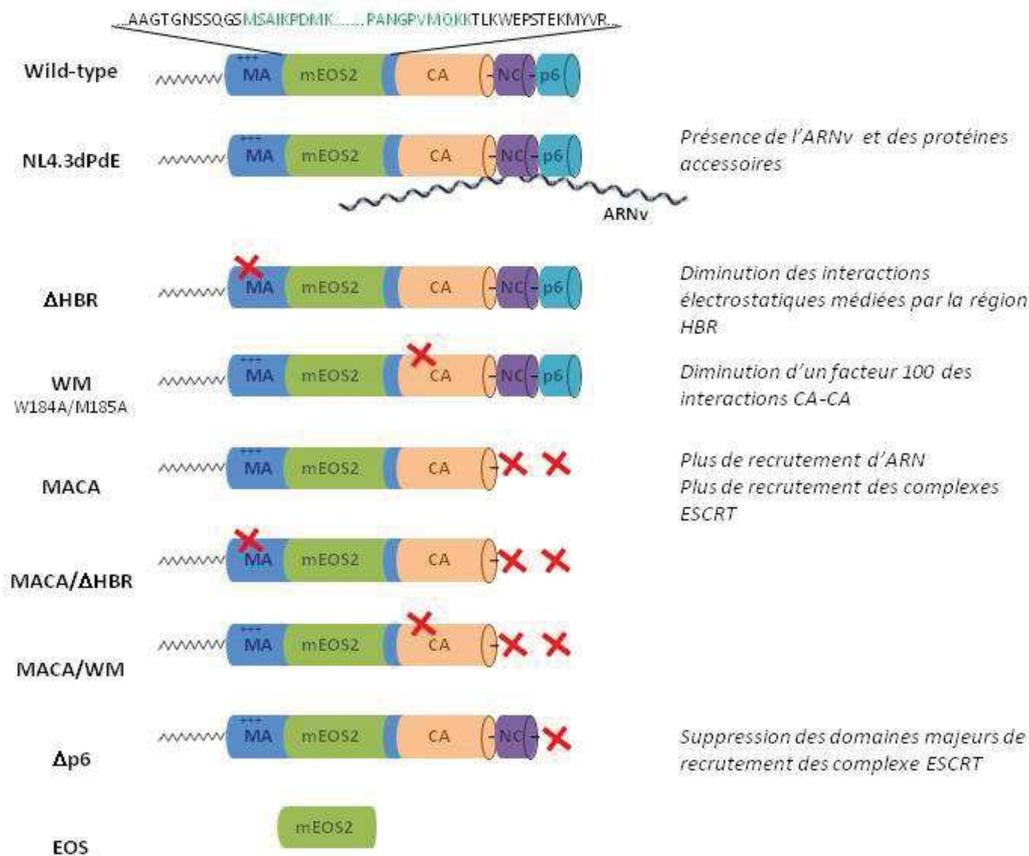


Figure 44 : Schéma des constructions de Gag-mEOS2 réalisées et leur impact sur les étapes d'assemblage de Gag du VIH-1. En bleu : le domaine matrice MA - En vert : mEOS2 - En orange : le domaine capsid CA - En violet : le domaine nucléocapsid NC - En bleu clair : le domaine p6 - sp1 et sp2 sont représentés par des tirets reliant les domaines majeurs de Gag - Les croix rouges représentent les sites qui ont été modifiés

Nom		Séquence nucléique	Séquence protéique	Taille
WT	région HBR	CGC CCC GGC GGC <u>AAG AAG AAG TAC AAG CTG AAG</u> CAC ATC GTG TGG	R P G G <u>K K K Y K L K</u> H I V W	82 kDa
	WM	GAC GTG AAG AAC <u>TGG ATG</u> ACC GAG ACC CTG	D V K N <u>W M</u> T E T L	82 kDa
ΔHBR	délétion HBR	CGC CCC GGC GGC CAC ATC GTG TGG	R P G G _H I V W	81.2 kDa
Gag-WM	mutation WM	GAC GTG AAG AAC <u>GCA GCT</u> ACC GAG ACC CTG	D V K N <u>A A</u> T E T L	82 kDa
MACA	insertion stop	GCG ACC ATC ATG <u>TAG</u> CAG CGC GGC AAC	A T I M <u>Stop</u> Q R G N	69 kDa
ΔHBR/WM	délétion HBR	GC CCC GGC GGC CAC ATC GTG TGG	R P G G _H I V W	81.2 kDa
	mutation WM	GAC GTG AAG AAC <u>GCG GCG</u> ACC GAG ACC CTG	D V K N <u>A A</u> T E T L	
MACA-WM	mutation WM	GAC GTG AAG AAC <u>GCG GCG</u> ACC GAG ACC CTG	D V K N <u>A A</u> T E T L	69 kDa
	insertion stop	GCG ACC ATC ATG <u>TAG</u> CAG CGC GGC AAC	A T I M <u>Stop</u> Q R G N	
Δp6	Insertion stop	CCC GGC AAC TTC <u>TAG</u> CAG AGC CGC CCC	P G N F <u>Stop</u> Q S R P	76 kDa

Tableau 4 : Séquences nucléiques et protéiques des constructions de Gag-mEOS2 réalisées. Les séquences sauvages sont spécifiées en haut du tableau (WT). Les mutations sont soulignées et en gras sur les séquences nucléiques et protéiques. Les délétions sont représentées sur les séquences protéiques par un tiret bas entre les aminoacides restant. La taille des protéines exprimées par chaque construction est spécifiée à droite du tableau. Les séquences nucléiques sont obtenues par séquençage après amplification et purification des plasmides obtenus par mutagenèse et après une première vérification de la mutation. Les séquences protéiques sont obtenues après traduction informatique de la séquence nucléique à partir du premier ATG de la MA..

1. Caractérisation de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants

1.1. Gag-(i)mEOS2 et ses mutants d'assemblage

Afin d'examiner le rôle des différents domaines de Gag dans la dynamique d'assemblage membranaire, la première étape a été de réaliser une série de mutants de ces domaines.

Deux constructions plasmidiques ont été utilisées pour cette étude :

- **pGag-(i)mEOS2** : ce plasmide code pour la protéine Gag seule, fusionnée à la protéine fluorescente photo-activable mEOS2 en position C-terminale de la matrice. L'insertion d'un fluorophore à cette position n'interfère pas sur le trafic intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 et permet la production de VLPs dont la morphologie est très similaire aux VLPs produites par Gag WT sans fluorophore [Hübner et al., 2007]. Cette construction est celle utilisée pour réaliser les mutants des domaines de Gag-(i)mEOS2.

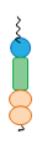
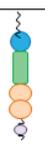
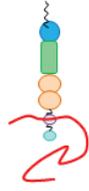
Tous les plasmides codant pour Gag-(i)mEOS2 seule sont sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV) induisant la surexpression intracellulaire de ces protéines lorsqu'on les transfecte dans les cellules. L'ARNm transcrit est Rev-indépendant, c'est à dire que la séquence de l'insert codant pour Gag-(i)mEOS2 a été modifiée pour ne pas nécessiter la protéine virale Rev pour son export nucléaire.

- **pNL4.3ΔPolΔEnv-Gag-(i)mEOS2** : la deuxième construction code pour la protéine Gag fusionnée au fluorophore mEOS2 en position C-terminale de la matrice et les protéines accessoires. Cette construction permet également la transcription de l'ARN génomique viral contenant notamment la séquence d'encapsidation Psi, site de reconnaissance spécifique de l'ARNv par le domaine NC de Gag, et la séquence RRE.

La construction pNL4.3ΔPolΔEnv-Gag-(i)mEOS2 (appelée pNL43dPdE dans le texte) ne contient pas les gènes codant pour les enzymes virales (*pol*) et les glycoprotéines d'enveloppe (*env*). Les VLPs produites par cette construction sont donc immatures et non infectieuses, à l'instar des VLP produites par Gag-(i)mEOS2 seule [Chen et al., 2014]. L'insert est sous contrôle du promoteur viral (les régions LTR), et l'élongation de la transcription est régulée par le complexe viral Tat/TAR. Contrairement à l'ARNm transcrit par pGag-(i)mEOS2, l'export de l'ARNm transcrit par pNL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 est Rev-dépendant.

Les mutants de Gag-(i)mEOS2 ont été obtenus par mutagénèse dirigée (Matériel & Méthodes - page 183). Les domaines de Gag mis en évidence pour avoir un impact sur l'assemblage des particules du VIH-1 ont été mutés ou délétés à partir du plasmide pGag-(i)mEOS2 (figure 44 et tableau 4):

- Au sein du domaine matrice (MA), nous avons réalisé la délétion de la région hautement basique HBR 26-KKKYKLLK-32 (mutant Gag-(i)mEOS2-dHBR). Ceci ne change pas la

Plasmide pGag-(i)mEOS2	Nom du mutant	Quelle protéine est exprimée?	Rôle de la région mutée dans les étapes tardives de l'assemblage		A quelle question répond-il?
	Gag-(i)mEOS2 WT	Protéine Gag-(i)mEOS2 sauvage 			
	Gag-(i)mEOS2 dHBR	Protéine Gag-(i)mEOS2 sans la région hautement basique de la MA 	HBR	Interactions électrostatiques HBR/lipides acides de la membrane Spécificité d'interaction Gag/membrane plasmique via une interaction directe entre le HBR et le PI(4,5)P2	Quelle est le rôle des interactions électrostatiques MA/membrane dans la dynamique de Gag-(i)mEOS2 au cours de l'assemblage viral?
	Gag-(i)mEOS2 WM	Protéine Gag-(i)mEOS2 dont le site de dimérisation de la CA est non fonctionnel 	¹⁸⁴ WM ₁₈₅	Multimérisation de Gag via des interactions CA-CA	Quel est le rôle de la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 via les interactions CA-CA dans l'assemblage viral?
	MACA-(i)mEOS2	Domaines MA, CA et sp1 de la protéines Gag-(i)mEOS2 	NC p6	Recrutement d'ARN cellulaire ou viral favorisant la multimérisation	Quelle est l'importance du recrutement d'ARN cellulaire lors de l'assemblage viral?
Gag-(i)mEOS2 dp6	Protéine Gag-(i)mEOS2 ne contenant plus le domaine p6 	p6	Recrutement des complexes ESCRT nécessaires à la scission membranaire et la libération de la particule virale	Pouvons-nous déterminer la signature dynamique de la libération de la particule virale?	
Plasmide pNL4.3ΔPolΔEnv	Nom de la construction	Quelle protéine est exprimée?	Rôle de l'élément viral dans les étapes tardives de l'assemblage		A quelle question répond-il?
	NL4.3dPdE Gag-(i)mEOS2	Protéine Gag-(i)mEOS2 sauvage + ARNv + protéines accessoires 	ARNv (séquence Psi et RRE) Protéines régulatrices et accessoires	multimérisation de Gag Eléments viraux, plus proche des conditions physiologiques	La dynamique d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 est-elle différente lorsqu'elle recrute l'ARNv au lieu d'un ARN cellulaire?

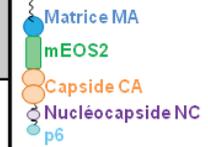


Tableau 5 : Présentation des principales protéines Gag-(i)mEOS2 utilisées pour l'étude de leur dynamique à la membrane plasmique des cellules T. Le tableau est divisé en 3 parties : la première partie à gauche présente le plasmide permettant l'expression de la protéine Gag-(i)mEOS2, le nom du mutant que nous utilisons dans cette étude, et enfin la protéine exprimée avec un schéma représentant cette protéine (la délétion de la région HBR au sein du domaine MA est représentée par un cercle incomplet, la délétion des domaines NC et/ou p6 est représentée par l'absence des domaines délévés, la mutation des acides aminés 184-WM/AA-185 est représentée par un point marron au niveau du domaine C-terminal de la CA, l'ARNv est représenté en rouge)

La deuxième partie présente le rôle des domaines mutés ou délévés dans les étapes tardives de l'assemblage viral. La dernière partie présente les informations que nous souhaitons obtenir grâce à ce mutant.

structure globale de la MA [Chukkapalli et al., 2008] mais supprime la région impliquée dans l'interaction MA/PI(4,5)P2 et ainsi l'adressage spécifique de Gag à la membrane plasmique [Saad et al., 2006 ; Shkriabai et al., 2006]

- Au sein du domaine capsid (CA), l'interface de dimérisation de la CA a été mutée : les acides aminés 184-WM-185 qui le compose ont été changés en deux alanines (mutant Gag-(i)mEOS2-WM). Cette mutation diminue par 100 la capacité de la protéine à multimériser *in vitro* tout en conservant la structure secondaire de la protéine [Datta et al., 2007]
- Les domaines C-terminaux NC et/ou p6 ont été supprimés (mutants MACA-(i)mEOS2 et Gag-(i)mEOS2-dp6). Le domaine NC permet le recrutement d'ARN (cellulaire ou viral) afin de favoriser la multimérisation de Gag [Bowzard et al., 1998 ; Burniston et al., 1999 ; Grigorov et al., 2007 ; Hogue et al., 2009], et le domaine p6 permet le recrutement des complexes ESCRT pour catalyser la fission des membranes virales et cellulaires [Von Schwedler et al., 2003]. Leur délétion supprime ainsi un élément structural de l'assemblage et empêche la libération des particules virales.

La présence des mutations ou délétions réalisées dans la séquence codant pour Gag-(i)mEOS2 est vérifiée par séquençage après mutagénèse et après amplification du plasmide.

Les informations que nous souhaitons obtenir à partir de l'expression des protéines Gag-(i)mEOS2 WT et mutantes pour l'étude dynamique sont présentées dans le tableau 5:

- La protéine Gag-(i)mEOS2 WT exprimée seule recrute les ARN cellulaires et tous les composants nécessaires pour réaliser l'assemblage viral. Cette protéine nous sert de référence d'un assemblage productif.
- La protéine Gag-(i)mEOS2 dHBR correspond à la protéine Gag-(i)mEOS2 dont la région hautement basique de la matrice a été supprimée. Cette protéine n'est donc plus capable d'interagir avec les lipides acides de la membrane, et plus spécifiquement avec les PI(4,5)P2 de la membrane plasmique. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer le rôle des interactions spécifiques HBR/membrane dans le processus d'assemblage viral.
- La protéine Gag-(i)mEOS2 WM correspond à la protéine Gag-(i)mEOS2 dont l'interface de dimérisation de la CA est non fonctionnelle (mutation 184-WM/AA-185). Cette protéine ne peut donc plus interagir avec elle-même avec la même efficacité grâce aux interactions CA-CA, ce qui induit un défaut de multimérisation de la protéine Gag-(i)mEOS2. Nous souhaitons ainsi comprendre le rôle de la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 grâce à l'interface de dimérisation de la capsid dans l'assemblage viral.
- La protéine MACA-(i)mEOS2 correspond à l'expression des domaines MA, CA et sp1 seuls (délétion des domaines NC, sp2 et p6). Cette protéine ne peut plus recruter d'ARN pour favoriser la multimérisation de la protéine, même si l'interface de dimérisation de la CA est

intacte. Par ailleurs, cette protéine ne peut pas non plus recruter les complexes ESCRT afin de catalyser la scission membranaire dans le cas où un bourgeon viral serait formé. Nous utilisons cette construction pour déterminer l'impact du recrutement d'ARN cellulaire dans l'assemblage viral. Cependant, cette construction ne permet pas une interprétation très fine, puisque les domaines NC et p6 interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires lors des étapes tardives de la réplication virale.

- La protéine Gag-(i)mEOS2 dp6 correspond à la protéine Gag-(i)mEOS2 sans le domaine p6. Cette protéine peut donc réaliser un processus d'assemblage mais ne recrute plus les protéines ESCRT nécessaires à la scission membranaire des particules virales. Nous espérons pouvoir utiliser cette construction pour déterminer la signature dynamique de la libération de la particule virale dans le milieu extracellulaire. Théoriquement, l'assemblage de Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 dp6 devrait être équivalent, à l'exception du relargage de la particule virale qui ne devrait pas apparaître dans le cas de Gag-(i)mEOS2 dp6. En comparant les dynamiques relatives de ces deux conditions, nous devrions pouvoir distinguer le profil de la libération de la particule virale. Par ailleurs, en comparant les dynamiques de Gag-(i)mEOS2-dp6 avec la dynamique de MACA-(i)mEOS2, nous espérons pouvoir identifier le rôle du domaine p6 dans la dynamique d'assemblage et ainsi en extraire la participation du recrutement de l'ARN par le domaine NC.
- Les protéines présentant une double mutation (figure 44) Gag-(i)mEOS2 dHBR/WM (délétion de la région hautement basique de la MA et mutation de l'interface de dimérisation de la CA) et MACA-(i)mEOS2/WM (délétion des domaines NC, sp2 et p6 et mutation de l'interface de dimérisation de la CA) ont été réalisées afin de savoir s'il existe une synergie d'action entre les différents domaines de Gag-(i)mEOS2.
- La protéine Gag-(i)mEOS2 WT issue de l'expression du plasmide pNL4.3dPdE (appelée NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 dans le texte) correspond à la protéine Gag-(i)mEOS2 WT exprimée avec les protéines régulatrices et accessoires. Cette construction permet la transcription de l'ARNv, contenant les séquences reconnues par la NC de Gag-(i)mEOS2, et notamment la séquence signal d'encapsidation Psi et la séquence RRE. Nous utilisons cette construction pour comparer sa dynamique avec celle des protéines Gag-(i)mEOS2 WT exprimées seules afin de déterminer les différences qui pourraient apparaître dans un système plus proche des conditions physiologiques. Nous espérons également pouvoir utiliser cette construction pour déterminer l'impact du recrutement de l'ARNv au lieu des ARN cellulaires sur la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des cellules T au cours de l'assemblage viral.

La protéine Gag est myristoylée à son extrémité N-terminale. La délétion ou la substitution du site d'acylation (deuxième acide aminé G muté en A - mutant appelé Gag G2A) empêche la myristoylation de la protéine Gag. Cette approche nous aurait permis de connaître l'effet de

l'ancrage membranaire de Gag sur sa dynamique. Malheureusement, la construction Gag-(i)mEOS2 G2A n'a pas pu être obtenue par mutagenèse dirigée, malgré plusieurs tentatives. Il a été montré que cette mutation induit un défaut d'adressage de Gag [Yuan et al., 1993]. Cependant, ce mutant semble perdre son interaction avec les membranes, et il ne serait plus capable de produire des particules virales [Freed et al., 1994 ; Hermida-Matsumoto et al., 2000]. Notre étude est réalisée grâce à une technique de microscopie dynamique réalisée par illumination TIRF. Cette technique contient deux limitations majeures : seules les protéines situées à proximité de la membrane plasmique sont imagées, et il est impossible de suivre les protéines qui diffusent trop vite. Ainsi, les protéines qui diffusent dans le cytosol sont trop rapides et pas nécessairement dans le volume d'acquisition. Nous n'aurions peut-être pas pu obtenir d'informations à partir des protéines Gag-(i)mEOS2-G2A, si ces protéines n'interagissent pas ou très faiblement avec la membrane plasmique.

Avant de pouvoir utiliser nos protéines pour étudier la dynamique d'assemblage viral de Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des cellules T Jurkat par microscopie sptPALM/TIRF, nous devons tout d'abord caractériser nos différentes constructions. Cette caractérisation a pour objectif de répondre à trois questions principales : nos protéines sont-elles correctement exprimées dans notre modèle cellulaire? Les protéines Gag-(i)mEOS2 WT sont-elles capables de réaliser un assemblage viral productif dans notre système d'étude? Nos protéines Gag-(i)mEOS2 mutées présentent-elles un défaut d'assemblage en accord avec les mutations réalisées?

Pour y répondre, nous vérifions différents paramètres:

- L'expression intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 WT et ses mutants dans les cellules T Jurkat par FACS (Matériel & Méthodes - page 185)
- La production virale de Gag-(i)mEOS2 WT et ses mutants dans les cellules T Jurkat par immunoblot (Matériel & Méthodes - page 186-187)
- La localisation intracellulaire de Gag(i)mEOS2 WT et ses mutants dans les cellules T Jurkat par microscopie confocale (Matériel & Méthodes - page 187)
- L'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2 WT et ses mutants par flottaison de membrane (Matériel & Méthodes - page 184 et 187).

1.2. Expression de Gag-(i)mEOS2 et production virale dans les cellules T

1.2.1. Expression intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 par FACS

L'expression de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants dans les lymphocytes T CD4⁺ a été caractérisée par FACS (figure 45) et immunoblot (figure 46) (Matériel & Méthodes - page 185-187). Le FACS permet de connaître la viabilité des cellules T exprimant les protéines Gag-(i)mEOS2, le taux de transfection des cellules (% de cellules mEOS2 positives), et le taux d'expression des protéines dans les cellules mEOS2 positives (correspond à la moyenne

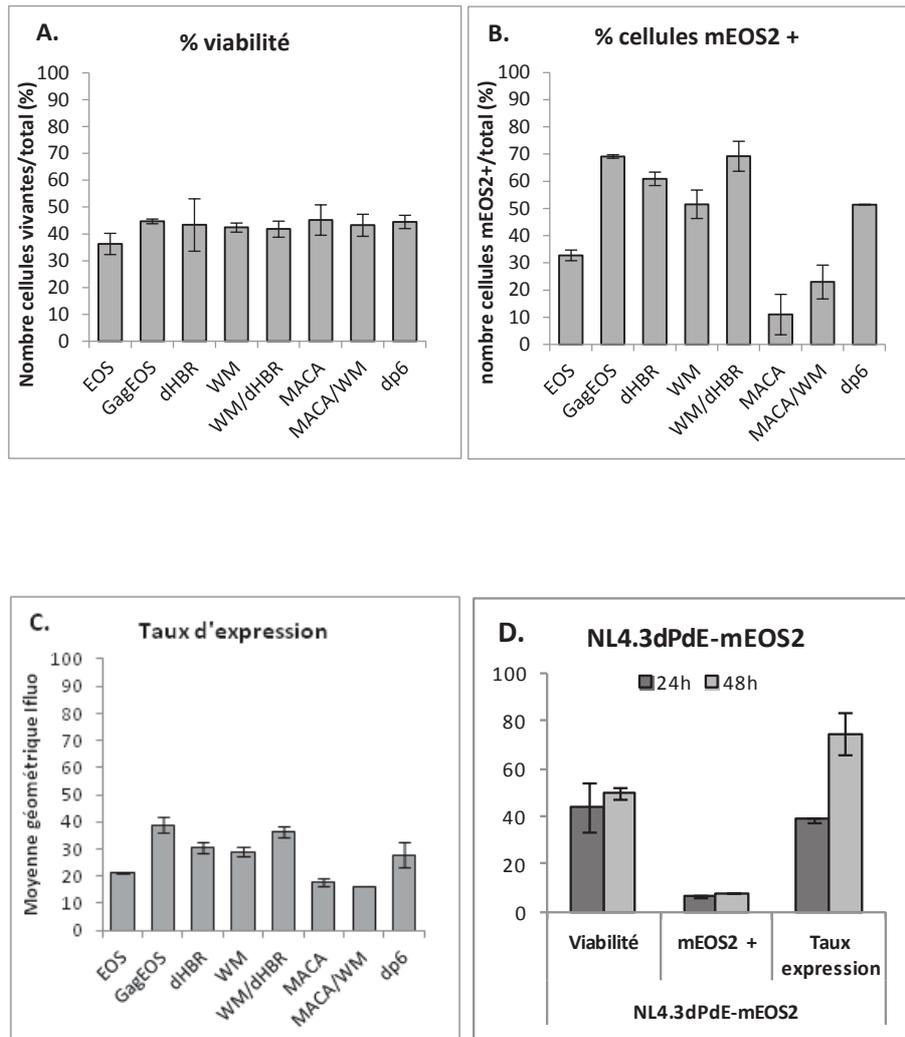


Figure 45 : Expression des constructions de Gag-(i)mEOS2 et ses dérivés en Jurkat par FACS. Les cellules sont récoltées 24h après électroporation. 2 millions de cellules sont transfectées avec 4µg de plasmide. 50 000 cellules sont récoltées pour réaliser le FACS tandis que les autres cellules sont lysées pour l'analyse par immunoblot **A. Pourcentage de viabilité des cellules** exprimant les différentes protéines 24h post-transfection. La viabilité est mesurée grâce à la représentation SSC fonction de FSC (*side-scattered light*, i.e la granulosité des cellule fonction de *forward-scattered light*, i.e leur taille) **B. Pourcentages de cellules mEOS2 positives** mesurées à partir de la distribution de l'intensité de fluorescence des cellules grâce aux spectres d'émission de la FITC 24h post-transfection **C. Moyenne géométrique des cellules mEOS2 positives** (unité arbitraire de fluorescence) 24h post-transfection. **D. Analyse des paramètres FACS pour la condition NL4.3dPdE-mEOS2** à 24h (gris foncé) et à 48h (gris clair) post-transfection. Ces résultats sont la moyenne de deux expériences distinctes à partir des mesures sur 25000 et 15000 cellules respectivement.

géométrique de la distribution de l'intensité de fluorescence des cellules mEOS2 positives). Le FACS est réalisé à partir de cellules T Jurkat récoltées 24h après électroporation des cellules avec les plasmides codant pour les protéines Gag-(i)mEOS2 WT et ses dérivés. La mesure de fluorescence est réalisée en mesurant l'intensité de fluorescence de la forme verte de mEOS2. Les plasmides pGag-(i)mEOS2 et pNL4.3dPdE-Gag(i)mEOS2 étant deux constructions différentes, et sous contrôle de promoteurs différents, la condition NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 a été représentée dans un panel différent des autres conditions.

- **Viabilité cellulaire :**

La viabilité cellulaire des Jurkats 24h après électroporation des plasmides Gag-(i)mEOS2 (figure 45.A) est comprise entre 40% et 50% quelque soit la construction exprimée. De même, les cellules Jurkat électroporées avec le plasmide pNL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 (figure 45.D panel de gauche) présentent une viabilité moyenne d'environ 40% 24h et 48h après électroporation. La viabilité cellulaire des Jurkat semble donc équivalente pour toutes les conditions observées.

- **Taux de transfection des cellules et taux d'expression des protéines :**

Les protéines Gag-(i)mEOS2 WT et mutantes ne s'expriment pas de manière équivalente dans les cellules (figure 45.B et 45.C).

Les cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 WT, Gag-(i)mEOS2 WM, Gag-(i)mEOS2 dHBR et Gag-(i)mEOS2 dp6 représentent entre 50 et 70% des cellules totales (figure 45.B, cellules mEOS2 positives), avec un taux d'expression équivalent de 30 à 40 unités arbitraires de fluorescence (figure 45.C)

Les cellules exprimant MACA-(i)mEOS2 et MACA(i)mEOS2-WM ne représentent que 10 à 20% des cellules totales (figure 45.B, cellules mEOS2 positives). Le taux d'expression de ces protéines est également légèrement plus faible que les conditions précédentes, avec une mesure de fluorescence comprise entre 16 et 20 u.a (figure 45.C). L'efficacité de transfection semble faible pour ces constructions, et les protéines semblent également moins bien exprimées que les autres. Il est possible que les protéines MACA-(i)mEOS2 et MACA-(i)mEOS2-WM soient moins bien traduites ou plus susceptibles à la dégradation intracellulaire.

La proportion de cellules exprimant NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 est très faible (cellules mEOS2 positives), à 24h comme à 48h, avec 8% et 9% des cellules exprimant la protéine respectivement (figure 45.D - panel du milieu). Le taux d'expression de NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 WT dans les cellules est équivalent à celui des cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 WT, avec 38 ± 1 u.a 24h post-transfection et nettement supérieur 48h post-transfection avec 75 ± 8 u.a (figure 45.D - panel de droite). L'efficacité de transfection de cette construction est donc plus faible mais le taux d'expression dans les cellules possédant le plasmide est équivalent au Gag-(i)mEOS2 WT après 24h post-transfection.

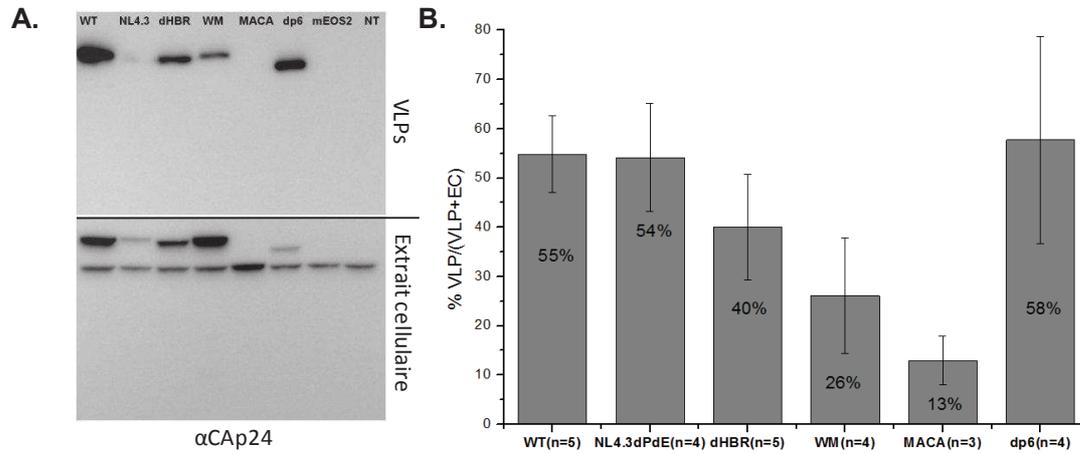


Figure 46: Analyse de la production virale de Gag-(i)mEOS2 par Western Blot. **A. Western blot des lysats cellulaires et VLPs purifiées.** Le panel du haut montre les VLPs purifiées et le panel du bas les extraits cellulaires lysés révélés par un anticorps anti-Cap24. Les Jurkats sont transfectées avec les différentes construction issues pGag-(i)mEOS2. Les cellules sont récoltées 24h post-transfection et lysées. La même quantité de protéine totale est déposée sur le gel. Les surageants viraux sont récoltés et les VLPs sont purifiées par ultracentrifugation sur coussin de sucrose. Le même volume de VLPs purifiées est déposé.. **B. Quantification de la production virale** à partir des western blot pour *n* expériences indépendantes. L'intensité de luminescence de chaque bande est mesurée par imageJ pour calculer la production virale. La production virale correspond à la quantité de VLPs rapportée à la quantité totale de Gag-mEOS2 (au sein des VLP et à l'intérieur des cellules)

Nous souhaitons tout d'abord savoir si nos protéines étaient correctement exprimées dans notre modèle cellulaire. Grâce au FACS, nous pouvons estimer que le taux d'expression moyen de nos constructions est comparable entre les conditions 24h après transfection, même si le nombre de cellules exprimant les différentes protéines de Gag-(i)mEOS2 est variable selon les conditions.

1.2.2. Analyse de la production virale de Gag-(i)mEOS2 et de ses dérivés

Un assemblage viral productif conduit à la production de pseudo-particules virales (appelées VLPs). Les cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 WT devraient donc être capables de produire des VLPs. Un défaut de production virale est révélateur d'une altération de l'assemblage viral. Les protéines Gag-(i)mEOS2 mutées devraient donc théoriquement présenter un profil de production virale différent de celui observé lors de l'expression de Gag-(i)mEOS2 WT. En effet, la spécificité membranaire, les interactions CA-CA ainsi que le recrutement des ARNs et des ESCRT cellulaires sont des éléments primordiaux dans la production de ces VLPs [Freed, 2015]. Afin de vérifier la fonctionnalité de nos constructions Gag-(i)mEOS2 dans les Jurkat, nous avons donc vérifié la capacité de nos protéines à produire des VLPs (figure 46) (Calcul d'estimation de la production virale : Matériel & Méthodes - page 187).

Dans notre système, Gag-(i)mEOS2 WT et NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 présentent une production virale équivalente, respectivement de 55+/-8% et 54+/-11. Comme nous avons pu l'observer par FACS (figure 45.D), le taux d'expression de NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 est plus faible qu'avec les autres plasmides : nous estimons par immunoblot que Gag-(i)mEOS2 présente une expression intracellulaire près de 7 fois supérieure à celle de NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2.

La dimérisation de la CA ainsi que les domaines C-terminaux de Gag semblent importants pour réaliser un assemblage productif : dans notre système, la production virale induite par Gag-(i)mEOS2 WM est de 26+/-12%, soit une diminution de la production de VLP d'un facteur 2 par rapport à la production de VLPs induites par Gag-(i)mEOS2 WT. Cette diminution de la production virale est encore plus réduite lorsque les cellules expriment MACA-(i)mEOS2, avec près de 4 fois moins de VLPs produites (13+/-5%).

La région HBR et le domaine p6 en revanche semblent avoir moins d'effet sur la formation de VLPs. La délétion de la région HBR, Gag-(i)mEOS2 dHBR, ne diminue pas significativement la production virale, qui s'élève à 40+/-11%. Gag-(i)mEOS2 dp6 présente une production virale identique, voire légèrement supérieure à celle de Gag sauvage, avec 58+/-21% de production de VLPs. Cette observation est assez surprenante, notamment en ce qui concerne Gag-(i)mEOS2 dp6. En effet, il a été montré que les protéines Gag mutées ou délétées de leur domaine p6 ne pouvaient plus produire de VLPs [Ott et al., 2000 ; Von, Schwedler et al., 2003]. L'hypothèse que l'on peut émettre pour expliquer un taux de production virale si fort pour Gag-(i)mEOS2 dp6 vient de la manière dont on récolte les surnageants viraux. En effet, il semblerait

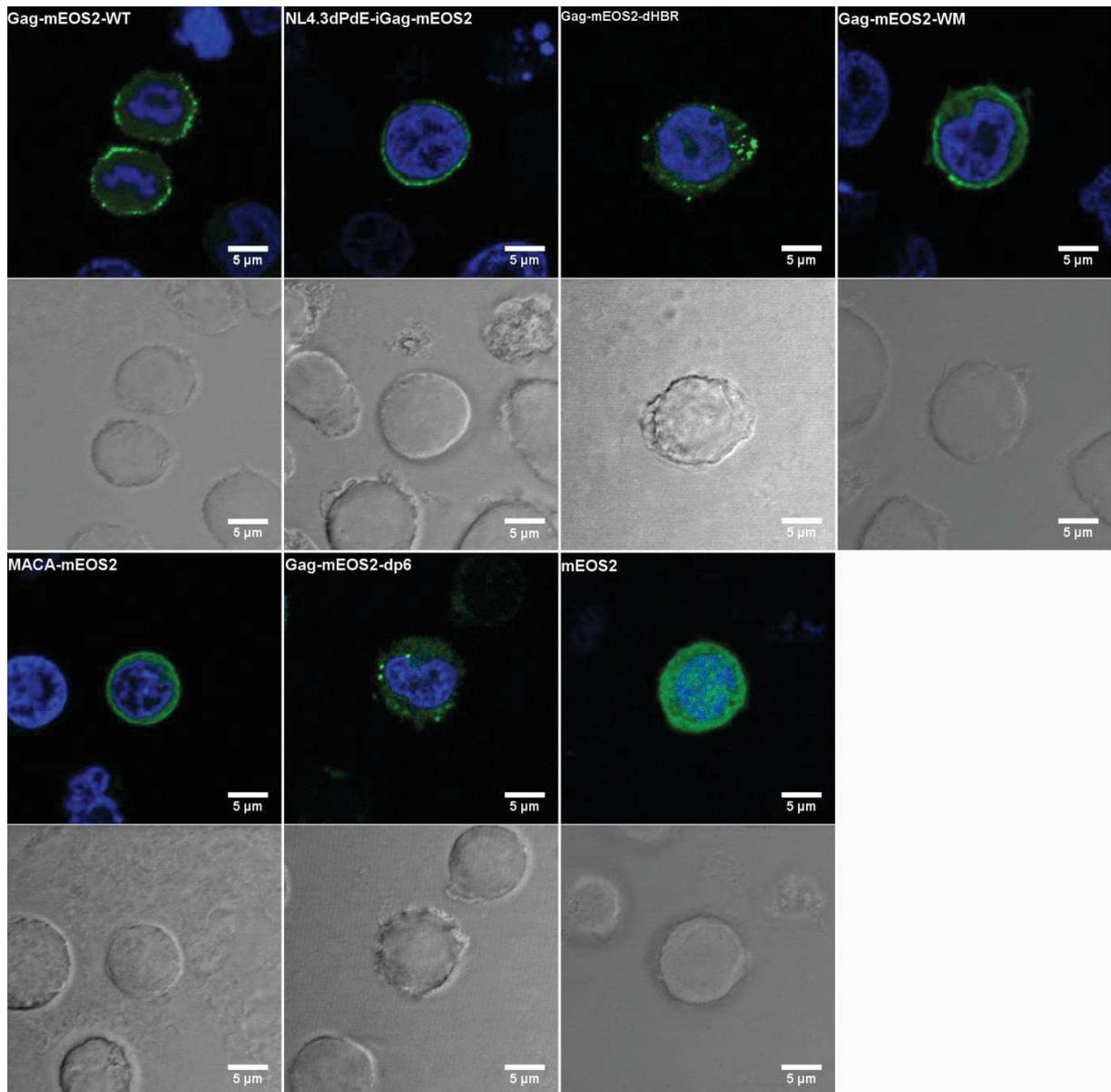


Figure 47 : Localisation intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 et ses dérivés dans les Jurkat par microscopie de fluorescence (microscopie confocale à laser). Image du haut : Gag-mEOS2 en vert correspond à la forme verte de mEOS2 acquise avec une excitation à 488nm. Noyau en bleu (DAPI). Image du bas en gris : Image en transmission Echelle 5μm.

que les protéines Gag-(i)mEOS2 dp6 forment des grappes de particules virales qui restent associées à la membrane plasmique, comme l'avaient montré Von Schwedler et al. en 2003 (cf figure 21). Si notre mutant Gag-(i)mEOS2 dp6 réalise le même type de structures en lymphocytes, alors il est possible que ces grappes soient détachées lors de la récolte par centrifugation des cellules, ces grappes sont alors retrouvées dans le surnageant viral utilisé pour purifier les VLPs. Pour vérifier cela, nous devrions vérifier par microscopie électronique que nous formons des structures identiques à celles retrouvées par Von Schwedler et al. en 2003.

En ce qui concerne le mutant de matrice, Ono et al. ont montré que les protéines Gag mutées au niveau de la région basique HBR étaient redirigées dans des vésicules intracellulaires [Ono et al., 2000]. L'origine de la production virale associée à ce mutant reste à approfondir. Au vue de ces travaux, il est toutefois intéressant de déterminer l'impact de nos constructions sur leur localisation intracellulaire.

Cette étude de la production virale par immunoblot nous permet de supposer que les protéines Gag-(i)mEOS2 et NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 réussissent à réaliser un assemblage viral productif. Les protéines Gag-(i)mEOS2 WM et MACA-(i)mEOS2 semblent présenter des dysfonctionnements dans la réalisation de l'assemblage viral, comme nous pouvions nous y attendre. En revanche, nous ne pouvons rien affirmer pour les protéines Gag-(i)mEOS2 dHBR et Gag-(i)mEOS2 dp6. L'observation de la localisation cellulaire de ces protéines, ainsi que l'étude de l'accrochage membranaire pourra peut-être apporter des informations complémentaires.

1.3. Localisation intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 et ses dérivés

La localisation intracellulaire de Gag(i)mEOS2 WT et ses mutants dans les cellules T Jurkat par microscopie confocale nous permet de connaître la répartition intracellulaire de nos protéines avec une résolution spatiale xy de l'ordre de 300nm (Matériel & Méthodes - page 187). Cette approche peut mettre en évidence des différences majeures de localisation entre les protéines. Toutes les molécules de mEOS2 émettent dans le vert à 519nm (après excitation à 506nm). Nous pouvons donc observer la localisation intracellulaire des protéines Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants (figure 47).

Gag-(i)mEOS2 WT ainsi que NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 présentent une accumulation de la protéine à la membrane plasmique avec l'apparition de sites membranaires définis. L'altération des interactions CA-CA via le mutant Gag-(i)mEOS2 WM montre que la protéine est située dans le cytosol et à la membrane plasmique. La délétion de la région basique HBR de la MA (Gag-(i)mEOS2 dHBR - figure 47, ligne du haut, 3ème image en partant de gauche) ainsi que la délétion du domaine p6 (Gag-(i)mEOS2 dp6 - figure 47, ligne du bas, deuxième image en partant de la gauche) redistribuent les protéines Gag dans ce qui apparaît être des vésicules intracellulaires. En effet, il semble que ces protéines Gag-(i)mEOS2 dHBR et Gag-(i)mEOS2 dp6 sont soit diffuses dans le cytoplasme soit dans ce qui semble être des vésicules intracellulaires.

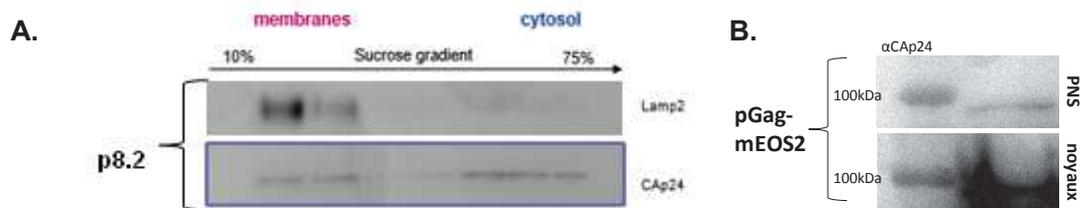


Figure 48 : A. Accrochage membranaire obtenu en Jurkat exprimant Gag/GagPol grâce au plasmide p8.2. Les Jurkat ont été récoltées 24h post-transfection du plasmide p8.2. Les cellules sont soniquées puis sont centrifugées à froid pour récupérer la portion post-nucléaire. Le PNS est déposé dans un gradient de sucrose et ultracentrifugé. Les fractions obtenues sont analysées par immunoblot avec un anticorps anti-capside. La révélation du marqueur Lamp2 est un contrôle de localisation des fractions membranaires. **B. Quantité de Gag-(i)mEOS2 retrouvée dans la fraction membranaire et cytosolique (PNS) par rapport au culot nucléaire.** Les Jurkat ont été récoltées 24h post-transfection du plasmide pGag-mEOS2. Le PNS est récolté et le culot est conservé pour déterminer la quantité de Gag perdue dans la portion nucléaire. La même quantité de protéines totales est déposée sur gel polyacrylamide et analysée par immunoblot avec un

Ces observations sont en accord avec la description d'A. Ono et al. en 2004, qui avaient observé que les protéines Gag-dHBR étaient concentrées dans des vésicules intracellulaires en cellules 293T. Les protéines MACA-(i)mEOS2 (figure 47, ligne du bas, 1ère image en partant de la gauche) sont diffuses dans le cytoplasme et ne présentent plus d'accumulation membranaire. L'expression de mEOS2 seule est localisée dans le cytoplasme et dans le noyau (figure 47, ligne du bas, 3ème image en partant de la gauche).

Afin de déterminer la nature des vésicules intracellulaires, nous avons tenté d'étudier la localisation relative des protéines Gag-(i)mEOS2 Δ HBR et Gag-(i)mEOS2 Δ p6 avec des marqueurs endosomaux (CD63, CD81), lysosomaux (Lamp1, Lamp2) et membranaires (CD45). Malheureusement, quel que soit le marqueur considéré, la qualité du marquage n'est pas suffisamment spécifique et/ou résolutive pour déterminer la nature des structures cellulaires. D'autres marquages devront être effectués pour s'assurer de l'origine de ces vésicules intracellulaires. Cependant, Gag-(i)mEOS2 dHBR et Gag-(i)mEOS2 dp6 présentent une localisation cellulaire différente de celle observée pour Gag-(i)mEOS2 WT. Cette observation permet de supposer que ces protéines présentent des dysfonctionnements dans les étapes tardives de la réplication virale, soit au niveau de l'adressage spécifique de ces protéines à la membrane plasmique, soit au cours de l'assemblage viral. Ainsi, même si nous n'avons pas pu observer de différences majeures quant à la production virale induite par ces protéines, il semblerait que le mécanisme menant à la formation de VLPs soit altéré.

1.4. Analyse de l'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2

L'analyse de l'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2 WT et de ses mutants par flottaison de membrane permet d'obtenir une estimation du taux de protéines en interaction avec les membranes totales de la cellule. L'assemblage viral est réalisé le long du feuillet interne de la membrane plasmique, grâce à des interactions Gag/membrane. Nous souhaitons donc mettre en évidence ces interactions par une approche biochimique. Nous pourrions ainsi observer un possible défaut d'accrochage membranaire de certaines protéines Gag-(i)mEOS2 mutées.

La technique de flottaison de membrane permet de séparer les membranes totales de la cellule du contenu cytosolique grâce à un gradient de densité. Les membranes, composées de lipides, sont moins denses que le contenu aqueux du cytosol. Les protéines qui interagissent avec les membranes resteront attachées aux membranes et apparaîtront au niveau des densités plus faibles.

Malheureusement, cette méthode n'a pu être utilisée pour déterminer l'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2 en lymphocytes T. La flottaison de membranes à partir de Lymphocytes T nécessite une grande quantité de cellules. Ces cellules sont lysées par sonication afin de lyser les membranes plasmiques tout en gardant le noyau intact, qui est exclu par

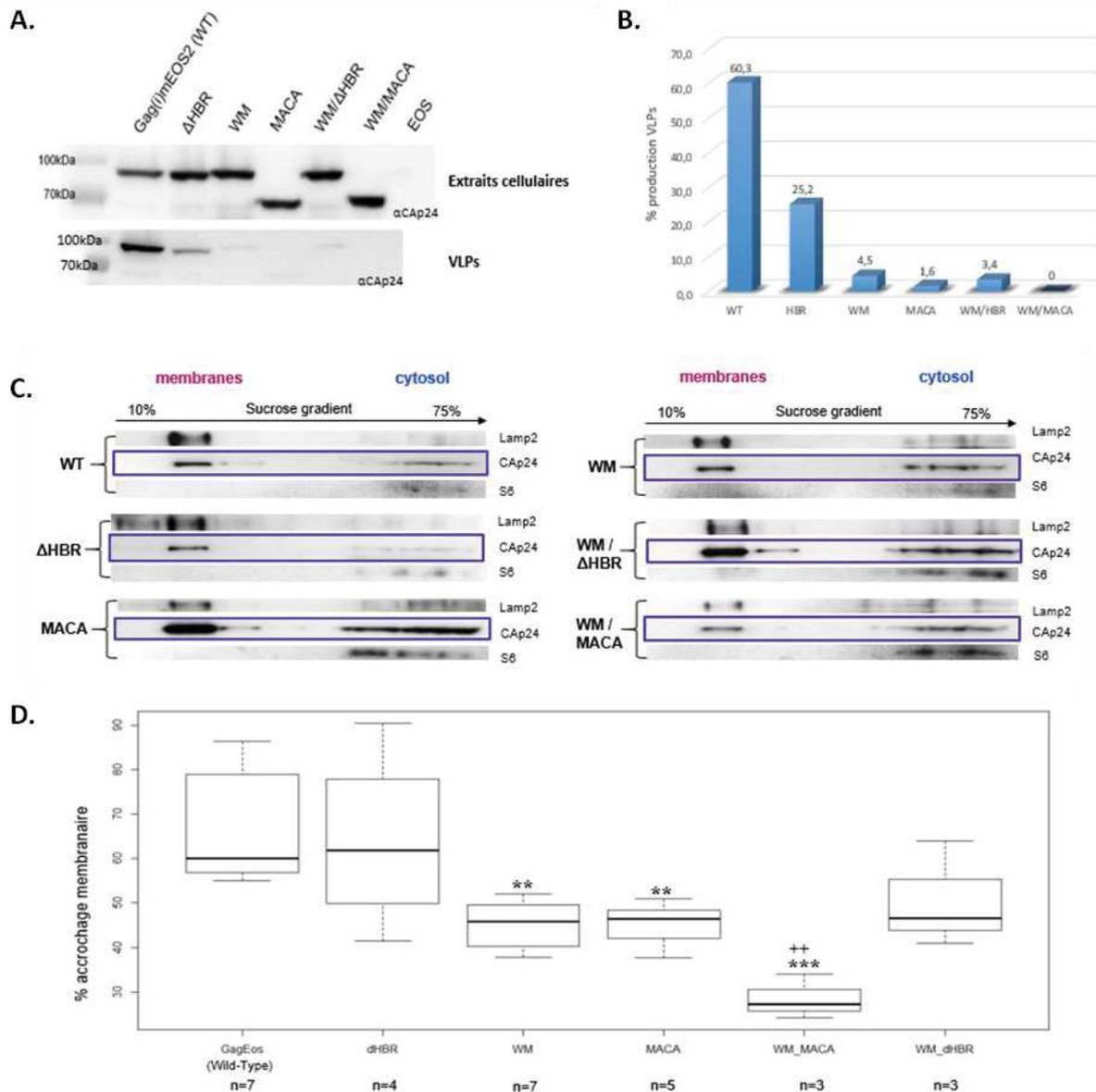


Figure 49 : Accrochage membranaire obtenu en 293T exprimant le plasmique pGag-mEOS2. A. Expression des protéines Gag-(i)mEOS2 WT et mutantes dans les 293T 24h post-transfection et B. la production virale associée. Les lysats cellulaires sont récoltés 24h post-transfection et analysés par immunoblot grâce à un anticorps anti-Cap24. C. Image des immunoblots issus des flottaisons de membranes. Les 293T ont été récoltées 24h post-transfection puis la flottaison de membrane est réalisée selon le schéma présenté figure 7. Le marqueur Lamp2 permet d'identifier les fractions membranaires tandis que le marqueur S6 permet d'identifier les fractions cytosoliques. D. Quantification de l'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2. La proportion de Gag à la membrane est quantifiée par ImageJ en mesurant l'intensité de la portion membranaire rapportée à la quantité de Gag total révélée par Immunoblot

Travail réalisé dans l'équipe par Elise Boilley, stagiaire Master EPHE.

centrifugation différentielle (schéma de la méthode de flottaison de membrane dans la partie matériels et méthodes, page 185). La lyse par sonication utilisée pour le fractionnement n'est pas optimale et il reste une quantité importante de cellules non lysées, perdues dans la portion nucléaire du fractionnement. Ainsi, la quantité de Gag-(i)mEOS2 obtenue dans la portion cytosolique (ou PNS *post-nuclear supernatant*) est trop faible pour être détectée en western blot (figure 48.B).

Différentes constructions codant pour Gag ont été testées pour optimiser la flottaison de membranes en Jurkat. La seule condition où il a été possible d'observer la protéine Gag aux membranes cellulaires des lymphocytes correspond aux cellules exprimant le plasmide p8.2 (figure 48.A). Ce plasmide code pour les protéines Gag, Gag-Pol et les protéines accessoires Tat, Rev, Nef, Vif et Vpr. L'insert est sous contrôle du promoteur CMV, assurant une expression forte. Deux hypothèses peuvent expliquer que seules les protéines exprimées par p8.2 soient détectables : soit ces protéines présentent un enrichissement membranaire plus grand que lorsque Gag est exprimée seule (plasmides pGag ou pGag-(i)mEOS2) ; soit les protéines GagPol et/ou les protéines accessoires permettent un accrochage membranaire plus fort par la stabilisation de Gag à la membrane. Cependant, nous ne connaissons pas le taux d'expression de ces protéines. Il est donc également possible que les protéines codées par p8.2 soient plus fortement exprimées.

Afin d'avoir une idée de l'accrochage membranaire de nos mutants, les cellules 293T ont été utilisées pour réaliser les flottaisons de membranes. L'objectif de cette expérience est d'analyser le rôle des différents domaines de Gag-(i)mEOS2 quant à leur capacité ou incapacité à stabiliser les protéines Gag aux membranes cellulaires (figure 49).

En 293T, l'expression de Gag-(i)mEOS2 entraîne une production virale de 60%. L'expression des Gag-(i)mEOS2 mutants entraîne une diminution de la production virale : 25% pour Gag-(i)mEOS2 dHBR, 5% pour Gag-(i)mEOS2 WM, 3% pour Gag-(i)mEOS2 dHBR/WM, 1.6% pour MACA-(i)mEOS2, et aucune production virale détectable pour MACA-(i)mEOS2-WM (figure 49.A et 49.B). La production virale en 293T semble différer de celle en lymphocytes T CD4+ en considérant ces valeurs, issues d'une seule expérience. Nous avons vu en introduction que les étapes tardives de la réplication virale pouvaient varier selon les types cellulaires. La différence de production virale pourrait donc être causée par le type cellulaire utilisé.

La proportion de Gag-(i)mEOS2 à la membrane est estimée à partir des marqueurs membranaires Lamp2 et cytosoliques S6 (figure 49.C). La quantification de l'accrochage membranaire est calculée grâce au rapport entre la quantité de protéines détectées dans les fractions 1 à 3, correspondant aux fractions membranaires comme en atteste le contrôle Lamp2, et la quantité de protéines totales (fractions 1 à 8). Nous réalisons donc le calcul suivant, avec $I_{1/2/3}$ =intensité des fractions 1, 2 et 3 et I =intensité des bandes révélées en WB

$$\% \text{ accrochage membranaire} = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{\sum_1^8 I} \times 100$$

Le pourcentage d'accrochage membranaire Gag-(i)mEOS2 WT est de 68+/-14% (figure 49.D). Cette valeur semble donc confirmer que les protéines Gag-(i)mEOS2 interagissent avec les membranes cellulaires.

La proportion de Gag-(i)mEOS2 dHBR à la membrane est équivalente à celle du Gag-(i)mEOS2 WT, malgré une variabilité plus grande (65+/-25%), ce qui suggère que la région basique de la matrice ne joue pas de rôle dans l'accrochage membranaire de Gag. La région HBR est impliquée dans l'interaction MA/PI(4,5)P2 et ainsi dans l'adressage spécifique de Gag à la membrane plasmique [Saad et al., 2006 ; Shkriabai et al., 2006]. La délétion de la région HBR pourrait donc ne pas avoir d'impact sur le taux d'accrochage membranaire de Gag-(i)mEOS2, mais uniquement sur le type de membrane ciblée par Gag-(i)mEOS2.

Gag-(i)mEOS2 WM et MACA-(i)mEOS2 présente un accrochage membranaire de 45+/-6% et 46+/-7% respectivement, soit 1.5 fois moins que le Gag-(i)mEOS2 WT. L'altération de la multimérisation de Gag-(i)mEOS2, via les interactions CA-CA d'une part et le recrutement d'ARNs d'autre part, semblent ainsi avoir un impact équivalent sur la stabilité de Gag-(i)mEOS2 aux membranes. Gag-(i)mEOS2 WM et MACA-(i)mEOS2 possèdent le myristate N-terminal et la région HBR au sein de la MA nécessaires à un ancrage spécifique dans la membrane plasmique. La baisse d'accrochage membranaire suppose ainsi que la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 est nécessaire à la stabilisation de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane.

L'accrochage membranaire obtenu avec le double mutant MACA-(i)mEOS2-WM est très faible (28+/-5%): ces mutations induisent une perte d'accrochage membranaire deux fois plus importante que les simples mutations par rapport au Gag-(i)mEOS2 WT. Ces deux domaines semblent donc présenter une synergie d'action quant au maintien de Gag-(i)mEOS2 à la membrane. Cette observation est en accord avec l'hypothèse précédente selon laquelle la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 participerait à sa stabilité d'interaction avec la membrane.

La double mutation Gag-(i)mEOS2 dHBR/WM présente un défaut d'accrochage équivalent à la protéine Gag-(i)mEOS2 WM (50+/-12%). La région basique HBR et le site de dimérisation de la CA ne semblent pas avoir d'action synergique quant à la stabilisation de Gag-(i)mEOS2 à la membrane. Cette observation suggère que la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 est nécessaire pour la stabilité membranaire, quelque soit la membrane ciblée par la protéine.

Les résultats d'accrochage de Gag-(i)mEOS2 aux membranes des cellules 293T sont en accord avec le modèle d'assemblage où l'ARN sert de plateforme structurale de multimérisation des protéines Gag à la membrane, renforcée et stabilisée par les interactions CA-CA [Ott et al., 2009 ; Kutluay et al., 2010 ; Jouvenet et al., 2011]. Nos résultats suggèrent en effet que la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 joue un rôle important dans les interactions Gag/membrane, comme l'ont montré Cimarelli et al., en 2000, Muriaux et al., en 2001, et Ono et al., en 2004.

Nous avons utilisé un modèle cellulaire que nous maîtrisons pour réaliser cette étude. Cependant, nous pouvons supposer que les protéines Gag-(i)mEOS2 ont un comportement similaire en cellules T Jurkat en ce qui concerne leur capacité à interagir avec les membranes cellulaires.

1.5. Conclusion

Cette caractérisation avait pour objectif de déterminer l'expression de nos constructions dans notre modèle cellulaire, d'estimer la capacité des protéines Gag-(i)mEOS2 WT et NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 de réaliser un assemblage viral productif dans notre système d'étude, et enfin de vérifier que les protéines Gag-(i)mEOS2 mutées présentent un défaut d'assemblage viral en accord avec les mutations réalisées.

Grâce aux différentes approches de biologie cellulaire, biochimie et microscopie, nous avons confirmé que nos différentes constructions étaient exprimées dans les cellules T Jurkat, même si le taux d'expression est plus faible pour les protéines MACA-(i)mEOS2 et que le plasmide pNL4.3dPdE- Gag-(i)mEOS2 présente un faible taux de transfection.

Nous pouvons estimer que les protéines Gag-(i)mEOS2 et NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 sont capables de réaliser un assemblage virale productif, sachant qu'environ 50% de ces protéines sont contenues dans des VLPs produites et que Gag-(i)mEOS2 semble interagir fortement avec les membranes.

Les protéines Gag-(i)mEOS2 mutées aux différents domaines semblent présenter des défauts d'assemblage viral, révélés soit par une baisse de la production virale, soit par une mauvaise localisation cellulaire, soit par un défaut d'accrochage membranaire. Nos résultats suggèrent que la région basique de la MA est importante pour l'adressage spécifique de Gag-(i)mEOS2, ce qui est en accord avec la littérature [Saad et al., 2006 ; Shkriabai et al., 2006, Freed 2015], tandis que la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 semble nécessaire à la stabilisation des protéines aux membranes. Cependant, ces hypothèses devraient être confirmées par d'autres approches. Notamment, il serait important de confirmer par microscopie électronique que notre protéine Gag-(i)mEOS2 dp6 présente des grappes de VLPs à la surface de nos modèles cellulaires comme l'avaient montré Von Schwedler et al. en 2003. Nous pourrions également vérifier la morphologie des VLPs purifiées de Gag-(i)mEOS2 dp6 par AFM, pour vérifier l'hypothèse selon laquelle notre protocole expérimental mène au détachement de ces "grappes" de VLPs, induisant une production virale apparente forte mais artéfactuelle. Concernant les protéines Gag-(i)mEOS2 WM, il serait intéressant de vérifier sa capacité de multimérisation, grâce aux méthodes *in vitro* utilisées par Datta et al. en 2007 à partir de protéines Gag-(i)mEOS2 WM purifiées.

Afin de réaliser l'étude de la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des cellules T Jurkat, les protéines avec les doubles mutations Gag-(i)mEOS2 dHBR/WM et MACA-(i)mEOS2-

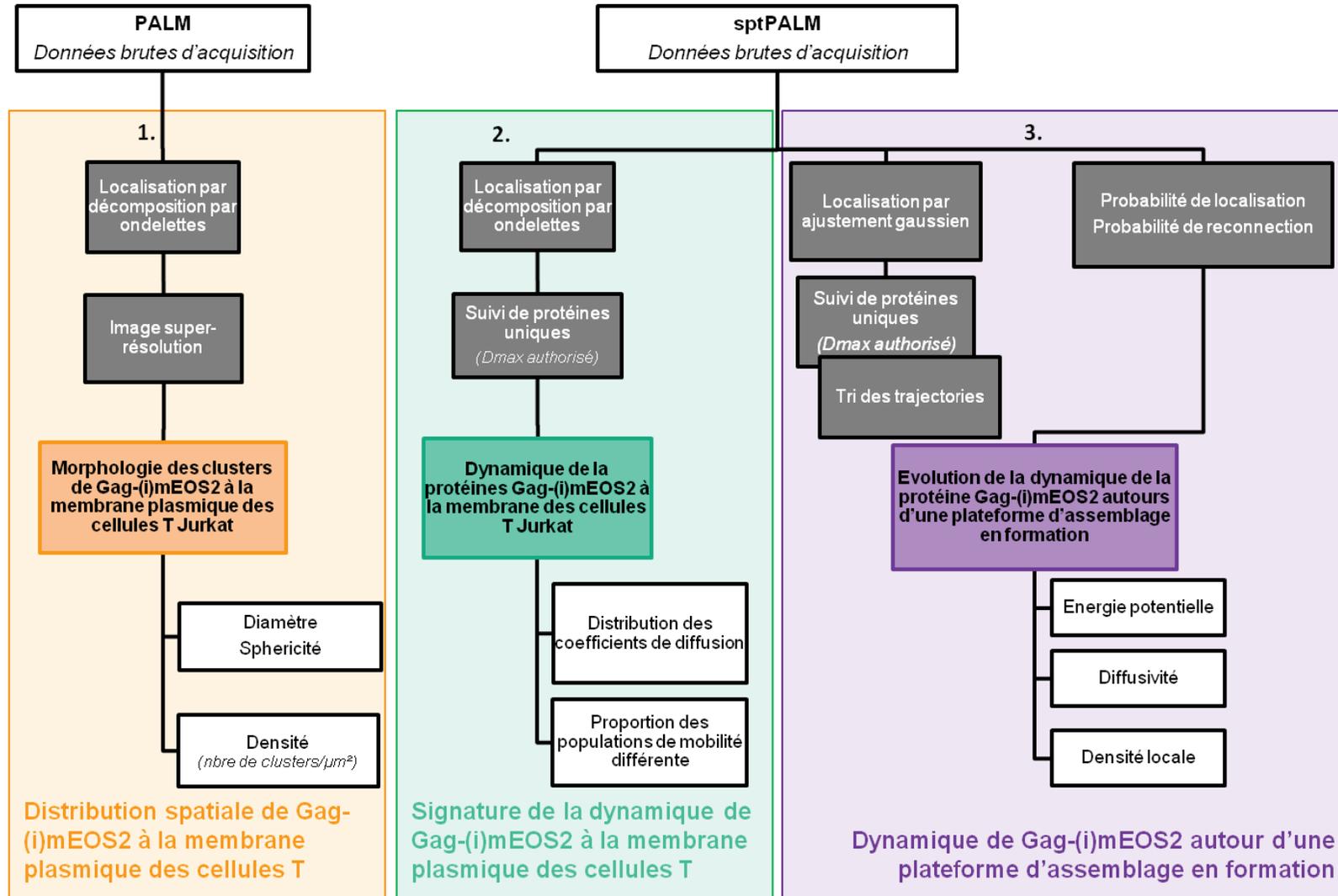


Figure 50 : Schéma de la stratégie d'étude de l'organisation moléculaire dynamique de la protéine Gag à la membrane des Lymphocytes T CD4+. L'étude de la dynamique d'assemblage de la protéine Gag du VIH-1 est réalisée en 3 étapes qui peuvent être séparées en 2 sections majeures selon la méthode de localisation et reconstruction des trajectoires utilisées. En vert, analyse à l'échelle cellulaire de toutes les protéines Gag-(i)mEOS2 en cellules T fixées (PALM) et en cellules Jurkat vivantes (sptPALM). En violet, analyse à l'échelle d'un virion individuel en formation. En gris : méthodes de reconstructions des localisations et des trajectoires. En couleur : objectif de l'étude par la technique présentée. En blanc: paramètres étudiés pour y répondre .

WM ne seront pas étudiées. En effet, nos premiers résultats suggèrent que le double mutant Gag-(i)mEOS2 dHBR/WM n'apportera pas d'informations supplémentaires aux constructions Gag-(i)mEOS2 dHBR d'une part et Gag-(i)mEOS2 WM d'autre part. Le double mutant MACA-(i)mEOS2 WM présente un accrochage membranaire très faible en 293T. Nous considérons par extension que cette accrochage membranaire est proche ou équivalent en Jurkat. Comme nous l'avons abordé plus haut, notre méthode sptPALM/TIRF ne nous permet pas d'étudier les protéines qui diffusent dans le cytosol du fait de leur diffusion rapide et de leur localisation, qui ne restent pas suffisamment longtemps dans le volume d'acquisition. Les protéines MACA-(i)mEOS2-WM ne pourraient donc *a priori* pas être étudiées de manière fiable.

La dynamique de toutes les autres constructions (présentées dans le tableau 5, page 92) peuvent cependant être étudiées par sptPALM/TIRF.

2. Stratégie d'analyse de la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T

Notre étude a pour objectif de comprendre comment une particule virale peut se former à la membrane de Lymphocytes T, et l'implication des différents domaines de Gag dans cet assemblage viral. Malgré quelques études cinétiques remarquables, il était jusqu'alors impossible de connaître les événements dynamiques de Gag au cours de ce processus à l'échelle de la protéine unique. Les contraintes moléculaires imposées à Gag lors du processus membranaire d'assemblage restent en conséquence encore peu décrites. Nous souhaitons adresser cette question grâce à la microscopie super-résolutive dynamique, le TIRF/sptPALM. Cette technique nous permet d'avoir accès à l'organisation moléculaire des protéines Gag au cours de l'assemblage au niveau de la membrane plasmique.

La stratégie d'analyse permettant de caractériser cette dynamique est divisée en trois étapes (figure 50):

1. la première étape est de caractériser la distribution spatiale de Gag-(i)mEOS2 à la membrane, et de déterminer l'impact de ses différents domaines sur la morphologie des plateformes d'assemblage.
2. la deuxième étape est de déterminer la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à l'échelle de la cellule à travers l'étude des coefficients de diffusions des protéines Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants à la membrane plasmique des Lymphocytes T.
3. la dernière étape est de comprendre la dynamique de Gag-(i)mEOS2 lors de la formation d'une plateforme d'assemblage. Cette étude est réalisée grâce à l'analyse de l'évolution dans le temps et l'espace des énergies mises en jeu au cours de la formation d'une particule virale, non plus à l'échelle de la cellule mais à l'échelle d'une VLP en formation.

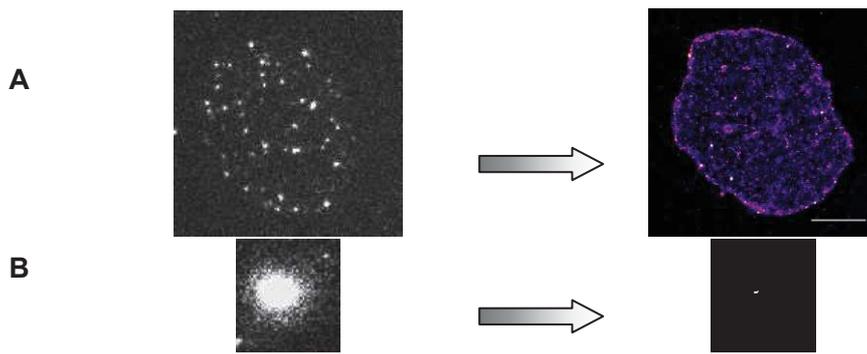


Figure 51 : A. Acquisition en PALM/TIRF de Gag-(i)mEOS2 WT. A gauche, image de l'acquisition en TIRF/PALM. Chaque point correspond à une molécule de Gag-mEOS2 photo-activée à un temps t . A droite, image de super-résolution après localisation par ondelette et correction de la dérive du mouvement. Echelle = $1\mu\text{m}$ **B. Mouvement intrinsèque du système mesuré à partir du mouvement de la bille.** A gauche, image de la bille lors de l'acquisition au temps $t=0$. A droite, image de super-résolution où toutes les localisations de la bille au cours du temps sont superposées (somme des localisations durant 26min). On remarque que la bille a dérivé au cours du temps de quelques pixels

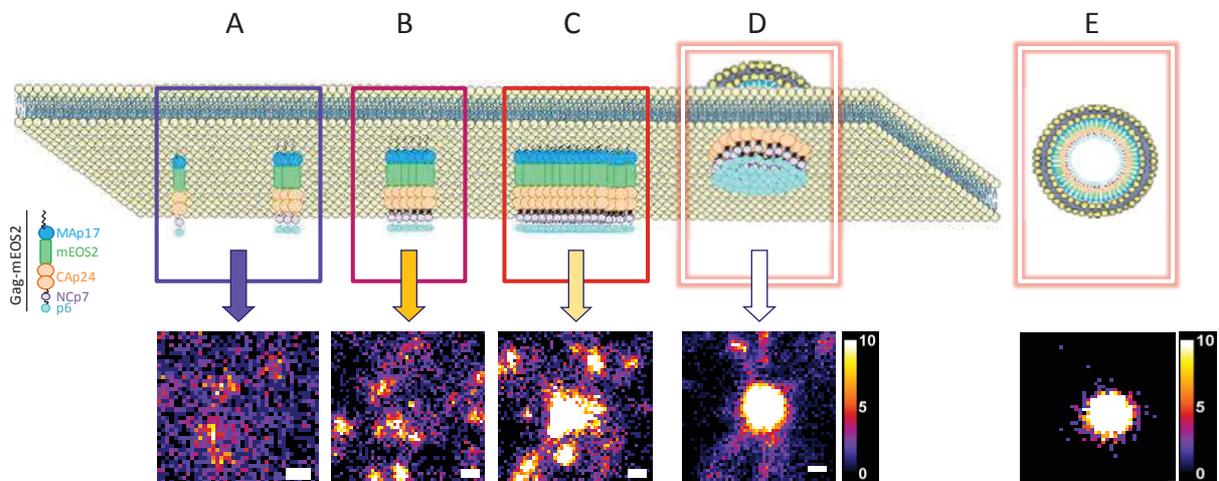


Figure 52 : Schéma de l'évolution de l'assemblage de la protéine Gag-(i)mEOS2. Le schéma du haut représente les différents niveaux de multimérisation de Gag-mEOS2 à la membrane (A-D) ainsi que les VLPs produites situées à l'extérieur de la cellule (E). En bas sont représentées des régions caractéristiques de ces états de multimérisation obtenus à partir d'une image de super-résolution obtenue à partir d'une cellule Jurkat exprimant Gag-mEOS2 WT. A = monomères et petits oligomères de Gag-mEOS2. B = petits clusters de Gag. C = plateforme

3. Etude de la morphologie des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants par nanoscopie PALM/TIRF

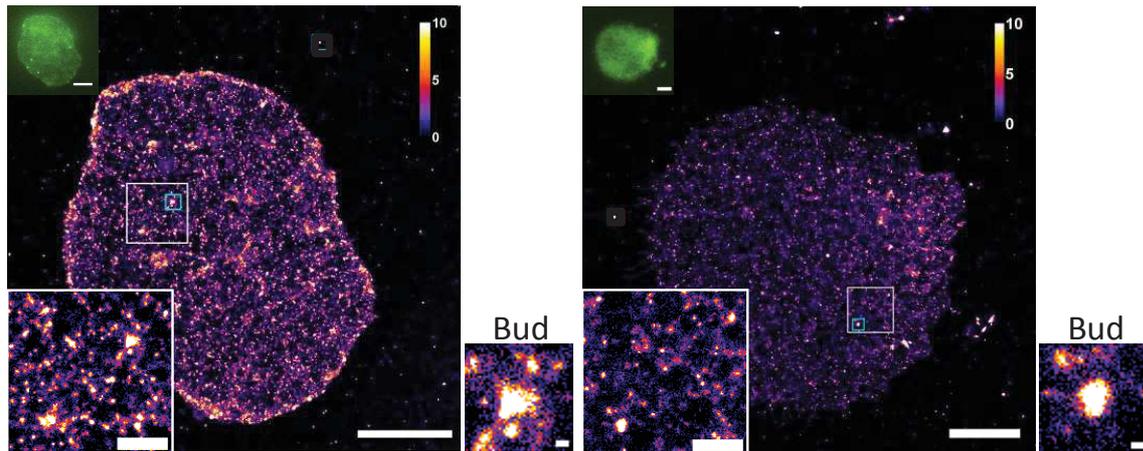
Avant de s'intéresser à la dynamique de Gag-(i)mEOS2, la première étape a été de caractériser la répartition spatiale de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants à la membrane plasmique des Lymphocytes T. En effet, l'assemblage viral mène à la formation de plateformes d'assemblage à la membrane plasmique qui sont ensuite relarguées dans le milieu extracellulaire. Nous souhaitons donc déterminer la morphologie de ces plateformes d'assemblage, et déterminer si certains domaines de Gag-(i)mEOS2 jouent un rôle sur cette morphologie. Cette partie a été réalisée en cellules T Jurkat fixées par la technique de PALM/TIRF (Matériel & Méthodes - page 188).

Afin de pouvoir comparer les résultats entre eux, il est nécessaire de s'assurer que les cellules expriment une quantité similaire de protéines Gag-(i)mEOS2. En effet, la concentration intracellulaire de Gag-(i)mEOS2 peut agir sur son organisation moléculaire à la membrane (plus la concentration est importante, plus il y a de plateformes d'assemblage formées) [Jouvenet et al., 2008 ; Ivanchenko et al., 2009]. Il est donc nécessaire d'avoir une expression moyenne de Gag-(i)mEOS2 équivalente entre les cellules. Pour déterminer cela, nous utilisons le principe de proportionnalité qui existe entre l'intensité de fluorescence et la concentration de molécules fluorescentes. On sélectionne donc les cellules qui ont une intensité de fluorescence moyenne en plein champs (dans le vert) de 2100 +/- 20% u.a.

3.1. Observation de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T

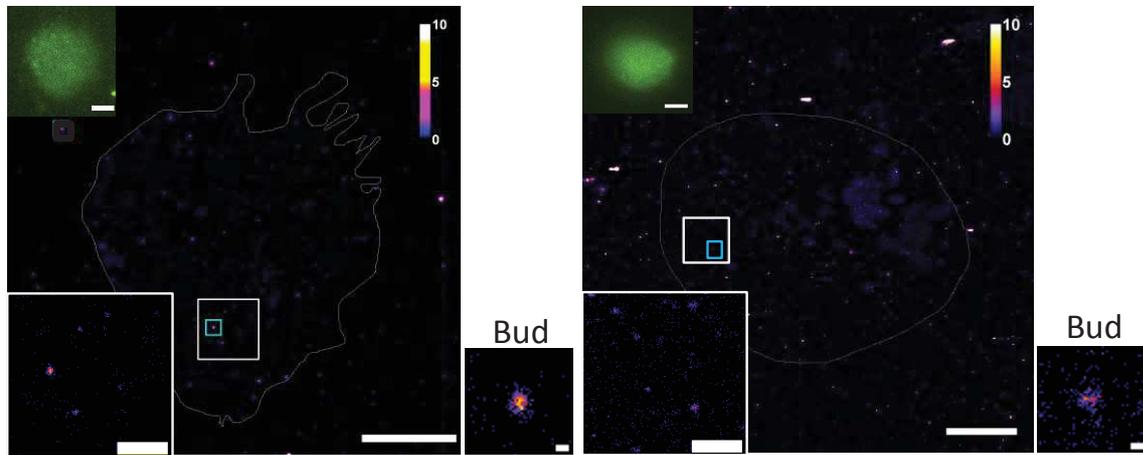
Les images de super-résolution sont obtenues après localisation par ondelettes des acquisitions en PALM (figure 51.A). Le mouvement interne du système est mesuré par une bille fluorescente inerte de 0.2µm (figure 51.B). En effet, le support sur lequel est posé l'échantillon peut avoir un mouvement intrinsèque au cours du temps. De l'ordre du pixel, cette dérive n'interfère pas avec les techniques de microscopie classique, mais biaise les résultats obtenus en super-résolution. Nous utilisons donc le mouvement de la bille comme contrôle interne, ce qui permet de repositionner chaque localisation à sa position réelle.

Sur les images de super-résolution, nous observons la densité de localisations des protéines Gag-(i)mEOS2 par pixel. Cette représentation nous permet d'identifier le niveau de multimérisation des protéines Gag-(i)mEOS2 (figure 52). Les monomères et petits oligomères de Gag-(i)mEOS2 apparaîtront ainsi en bleu/violet, les multimères en rose/fushia, les clusters de Gag-(i)mEOS2 en rouge/orange et enfin les plateformes d'assemblage et les VLPs en jaune/blanc. Grâce à cette représentation, nous pouvons estimer deux paramètres différents : la densité apparente de localisations (correspondant à la densité apparente de protéines) au sein des clusters observés grâce au gradient de couleurs utilisé, mais également le nombre de clusters par cellules que nous observons.



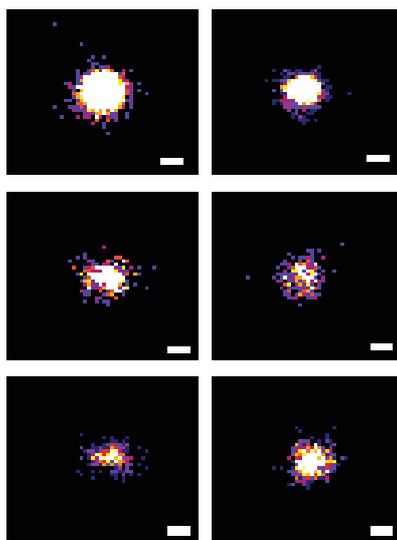
A. Gag-mEOS2 WT

B. Gag-mEOS2 WM



C. MACA-mEOS2

D. mEOS2



E. VLP immature purifiées

Figure 53 : Organisation spatiale des protéines Gag-mEOS2 à la membrane plasmique des Lymphocytes T Jurkat par microscopie TIRF/PALM. Les images PALM correspondent à la superposition de toutes les localisations obtenues au cours de l'acquisition. Calibration : nombre de localisations par pixel - le minimum correspond à 0 localisation par pixels en noir - le maximum correspond à 10 localisations/pixel en blanc. Tous les pixels qui contiendraient plus de 10 localisations seront représentés en blanc. **A-D. Image de super-résolution des protéines Gag-mEOS2 en Jurkat.** Chaque condition est représentée à différentes échelles : la première image, en haut à gauche représente la cellule en TIRF avant l'acquisition en PALM (échelle = 5µm). L'image centrale représente l'image de haute résolution de la totalité de la cellule vue par TIRF/PALM (échelle = 5µm). Une région au sein de la cellule est agrandie (échelle = 1µm), elle est représentée dans la cellule par un carré blanc. Au sein de cette région, un cluster dense en protéine Gag est agrandi (échelle = 100nm). Cette région est représentée sur la cellule par un carré bleu. **E. Image de super-résolution des VLPs purifiés.** Calibration : densité de localisations par pixel - le minimum correspond à 0 localisation par pixels en noir - le maximum correspond à 10 localisations/pixel en blanc. Echelle = 100nm

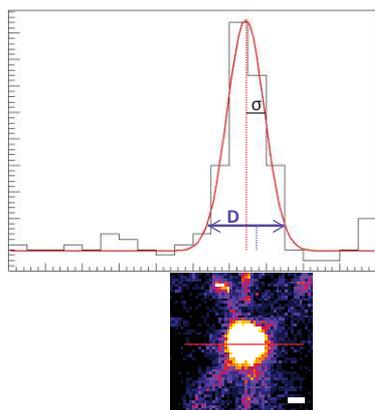
Les images de super-résolution obtenues grâce à l'expression de nos différentes protéines Gag-(i)mEOS2 sont représentées figure 53. Les protéines de Gag-(i)mEOS2 WT (figure 53.A) ne sont pas retrouvées de manière diffuse à la membrane plasmique mais sont réparties en clusters de taille apparente et de densité protéique apparente variables. On distingue ainsi de nombreux clusters que l'on associe à différents degrés de multimérisation Gag-(i)mEOS2 WT sur toute la surface des cellules. Les protéines Gag-(i)mEOS2 WM (figure 53.B) présentent une distribution membranaire identique aux protéines Gag-(i)mEOS2 WT.

La densité de localisations obtenue grâce à l'expression des protéines MACA-(i)mEOS2 (figure 53.C) est très faible. La répartition membranaire de ces protéines n'est cependant pas diffuse. Les protéines MACA-(i)mEOS2 sont également réparties en clusters, bien que ces structures semblent en apparence moins denses en localisations que les clusters de Gag-(i)mEOS2 WT. Le nombre de clusters formés par MACA-(i)mEOS2 semble également très faible.

Afin de s'assurer que les clusters protéiques observés ne sont pas dus au fluorophore mEOS2, nous avons contrôlé la répartition membranaire du fluorophore mEOS2 exprimé seul dans les Jurkat (figure 53.D). La détection des protéines mEOS2 par PALM/TIRF est faible, et nous ne pouvons reconstruire que très peu de localisations. Ceci suggère que la protéine mEOS2 seule ne présente presque aucune localisation membranaire. Quelques clusters peu denses en localisations apparaissent, et sont distribués de manière éparsée dans le champ d'acquisition. Cette observation suggère que la répartition membranaire de Gag-(i)mEOS2 que nous observons par PALM/TIRF est donc due aux protéines Gag-(i)mEOS2 et non pas au fluorophore mEOS2.

Il est intéressant de noter que l'on peut observer des clusters de Gag-(i)mEOS2 à l'extérieur de la cellule. Ces clusters forment une structure en apparence sphérique composée de protéines Gag-(i)mEOS2 hautement multimérisées. Nous supposons que ces clusters sont des VLPs produites par les cellules. Afin de déterminer la morphologie des VLPs telle qu'elle apparaît en PALM/TIRF, nous avons analysé une préparation de VLPs purifiées issues de Jurkats exprimant Gag-(i)mEOS2 WT (figure 53.E). Elles nous serviront de référence pour l'étude de la morphologie des plateformes d'assemblage.

Toutes ces observations sont en accord avec ce qui a pu être observé par microscopie confocale. En effet, nous avons pu observer que Gag-(i)mEOS2 WT est enrichie à la membrane en des sites définis. Gag-(i)mEOS2 WM est également enrichie à la membrane bien qu'aucun site spécifique ne semblait défini, contrairement à ce que l'on observe en super-résolution. Les protéines MACA-(i)mEOS2 présentaient un phénotype intracellulaire diffus. Le fait que MACA-(i)mEOS2 soit peu visible en TIRF semble confirmer la localisation cytosolique de cette protéine, et suggère qu'elle ne reste pas suffisamment longtemps en interaction avec la membrane pour être acquise de manière optimale par microscopie TIRF.



σ = rayon à 60% de la gaussienne

$$r(x)_{10\% \text{ gauss}} = 2.14 \times \sigma_x \quad [\mu\text{m}]$$

$$r(y)_{10\% \text{ gauss}} = 2.14 \times \sigma_y \quad [\mu\text{m}]$$

$$S_{10\% \text{ gauss}} = 3.14 \times r(x) \times r(y) \quad [\mu\text{m}^2]$$

$$D_{10\% \text{ gauss}} = 1000 \times 2 \times \sqrt{\frac{S_{10\% \text{ gauss}}}{3.14}} \quad [\text{nm}]$$

Figure 54: Schéma de l'ajustement gaussien utilisé pour calculer le diamètre des plateformes d'assemblage. Une plateforme telle qu'elle apparaît en image de super-résolution PALM est représentée en bas. Pour plus de clareté, une plateforme sphérique a été sélectionnée. Le trait rouge représente la section à partir de laquelle l'ajustement gaussien est réalisé. Le graphique situé en haut représente l'ajustement gaussien : en noir le nombre de localisations par pixel et en rouge l'ajustement par la gaussienne. Le centre de la gaussienne est représenté par une trait rouge en pointillés. Le diamètre D est calculé à partir du paramètre σ selon les équations situées à droite. Le diamètre D correspond au diamètre à 10% de la gaussienne

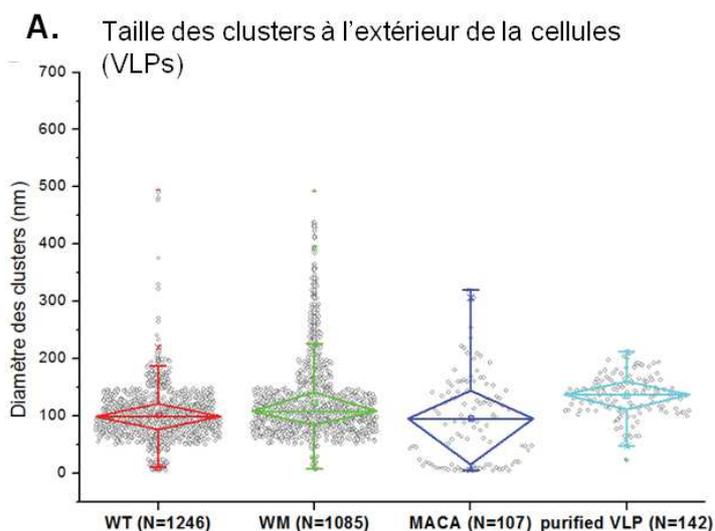
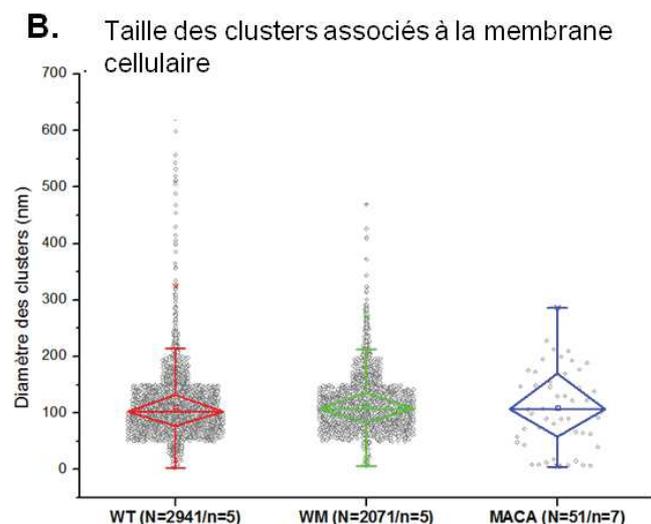


Figure 55: Distribution des diamètres des plateformes calculés pour chaque condition **A. à l'extérieur de la cellule** et **B. associées à la membrane cellulaire**. Gag-mEOS2 WT est représentée en rouge, Gag-mEOS2 WM en vert, MACA-mEOS2 en bleu et les VLP purifiées en bleu clair. Les points gris représentent les valeurs des tailles de chaque plateforme. N=nombre total de plateformes d'assemblage pour les n cellules étudiées



3.2. La morphologie des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2

La microscopie de super-résolution nous permet de distinguer différentes structures denses en Gag-(i)mEOS2 que l'on associe à des plateformes d'assemblage. Plus précisément, nous considérons un cluster de Gag-(i)mEOS2 comme étant une plateforme d'assemblage si la densité de localisations au centre de ce cluster est au moins 3 fois supérieure à la densité de localisations moyenne de Gag-(i)mEOS2 dans un rayon d'~600nm autour de la zone dense détectée.

Il est ainsi possible d'étudier ces plateformes individuellement, et notamment d'étudier leur morphologie. La morphologie des plateformes d'assemblage observées en super-résolution est examinée selon 2 paramètres : leur diamètre et leur sphéricité.

3.2.1. Le diamètre des plateformes d'assemblage

L'objectif est d'estimer la taille des clusters de Gag-(i)mEOS2 WT observés et de déterminer l'impact des domaines de Gag-(i)mEOS2 sur la taille des plateformes d'assemblage formées à la membrane des cellules T Jurkat d'une part et des VLPs produites d'autre part. Le diamètre des plateformes d'assemblage est calculé à partir d'un ajustement gaussien anisotrope sur les clusters de Gag-(i)mEOS2. Autrement dit, le cluster est associé à une structure arrondie dont la taille le long de l'axe x peut être différente de celle en y. On considère que le diamètre du cluster est proche du diamètre à 10% de la hauteur de la gaussienne (figure 54). Le niveau basal de localisations autour du cluster, associé aux premiers 10%, n'est donc pas pris en compte.

On différencie les clusters situés à l'extérieur de la cellule (figure 55.A) de ceux associés à la membrane cellulaire (figure 55.B).

- Clusters de Gag-(i)mEOS2 à l'extérieur de la cellule (VLPs) (figure 55.A) :

Les VLPs purifiées mesurent en moyenne 135+/-36nm de diamètre. Elles ont une taille globalement supérieures aux clusters analysés à l'extérieur des cellules qui expriment Gag-(i)mEOS2 WT et ses dérivés et leur distribution est plus homogène.

A l'extérieur des cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 WT et ses dérivés, les clusters présentent une taille moyenne très proche, les légères différences n'étant pas significatives. Les clusters extracellulaires formés par Gag-(i)mEOS2 WT mesurent en moyenne 101+/-45nm, ceux formés par Gag-(i)mEOS2 WM mesurent en moyenne 124+/-66nm et ceux formés par MACA-(i)mEOS2 ont un diamètre moyen de 96+/-76nm.

En ce qui concerne MACA, la distribution des tailles des clusters extracellulaires semble présenter 2 populations : une population dont les tailles sont petites, et une population plus proche des conditions Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM.

- Clusters associés à la membrane cellulaire (plateformes d'assemblage) (figure 55.B) :

Au sein des cellules, les tailles des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 sont identiques d'une condition à l'autre. En effet, la taille moyenne des plateformes formées par Gag-(i)mEOS2

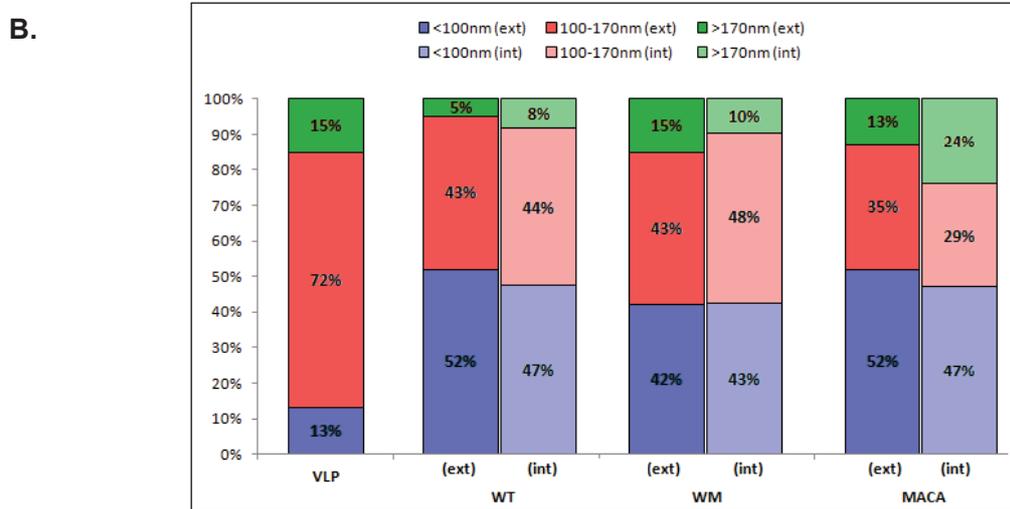
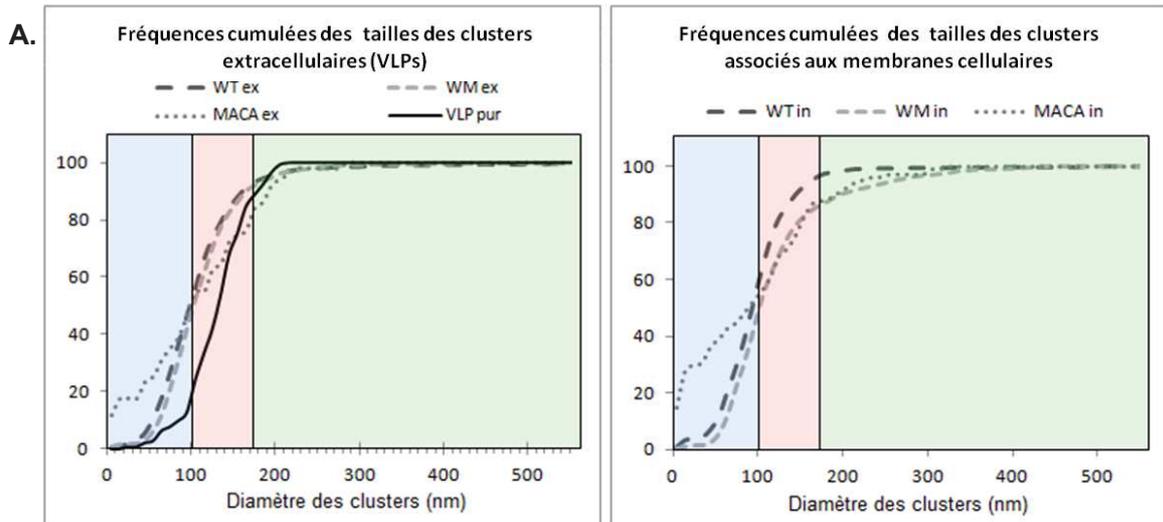


Figure 56 : A. Représentation des fréquences cumulées des tailles des clusters de chaque condition. A partir de cette représentation, et en prenant les VLP purifiées comme référence, nous pouvons extraire 3 populations : en bleu $D < 100\text{nm}$, en rouge $100 < D < 170\text{nm}$, en vert $D > 170\text{nm}$. **B. La proportion de chaque population** est représentée en dessous sous forme d'histogramme

WT est de 110 ± 56 nm, contre 115 ± 66 nm pour Gag-(i)mEOS2 WM et de 109 ± 69 nm en moyenne pour MACA-(i)mEOS2. Les distributions de tailles des plateformes d'assemblage formées par Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM (représentées par les points gris sur la figure) sont identiques. Les tailles des clusters formés par MACA-(i)mEOS2 présentent une distribution plus dispersée, bien que la taille moyenne soit identique.

Les différences observées entre les clusters associés aux membranes *versus* les clusters extracellulaires ne sont pas significatives considérant les variations internes à chaque conditions. Les clusters membranaires que nous considérons semblent donc correspondre à des bourgeons viraux dont l'assemblage est fini ou à des VLPs. Cependant, si l'on étudie la fréquence cumulée des tailles des clusters formés dans chacune des conditions (figure 56.A), les tailles des plateformes d'assemblage formées par Gag-(i)mEOS2 et ses dérivés évoluent différemment de celles des VLPs purifiées. Nous ne considérons donc peut être pas que des événements d'assemblage finis. Nous avons donc essayé de distinguer les différentes populations que nous observons.

- Différentes populations de clusters (figure 56) :

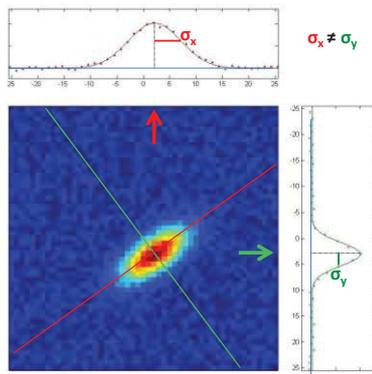
En considérant les VLPs purifiées produites par Gag-(i)mEOS2 WT comme référence, nous distinguons 3 populations (figure 56):

- **les clusters de petite taille**, dont le **diamètre est inférieur à 100nm** (en bleu sur la figure 56.A): nous associons ces clusters à des événements intermédiaires de l'assemblage de Gag-(i)mEOS2. En effet, au cours de l'assemblage viral, il semblerait que le nombre de protéines Gag-(i)mEOS2 augmente jusqu'à former un bourgeon viral. Ces petits clusters pourraient donc correspondre à des étapes précoces de l'assemblage viral.
- **les clusters de taille intermédiaire**, dont le **diamètre est compris entre 100 et 170nm** (en rouge sur la figure 56.A): ces clusters, correspondant à une taille proche des VLPs purifiées, sont associés à des événements dont l'assemblage viral est fini. C'est à dire que nous considérons ces clusters comme étant des bourgeons viraux prêts à être libérés s'ils sont associés aux membranes, ou des VLPs produites par les cellules s'ils sont à l'extérieur de la cellule.
- **les clusters de grande taille** dont le **diamètre est supérieur à 170nm** (en vert sur la figure 56.A) : nous considérons que ces clusters sont soit des plateformes d'assemblage dont la morphologie est altérée, soit des artéfacts dus à l'ajustement gaussien. Nous reviendrons sur l'interprétation de cette population dans la partie qui suit.

Lorsque l'on décompose les populations des VLPs purifiées selon ces 3 populations, 72% des VLPs totales ont un diamètre compris entre 100-170nm, 13% sont de taille inférieure, avec un diamètre moyen de 73 ± 10 nm, tandis que 15% ont une taille supérieure, avec un diamètre moyen de 189 ± 6 nm (figure 56.B). Ces valeurs sont nos références. Elles nous donnent une

	Diamètre moyen D<100nm	Diamètre moyen 100<D<170nm	Diamètre moyen D>170nm
VLP pur	73 +/- 10nm	135 +/- 10nm	189 +/- 6nm
Intracellulaire			
WT	73 +/- 10nm	127 +/- 9nm	240 +/- 50nm
WM	77 +/- 9nm	128 +/- 9nm	217 +/- 25nm
MACA	48 +/- 17nm	132 +/- 20nm	201 +/- 16nm
Extracellulaire			
WT	72 +/- 11nm	124 +/- 9nm	219 +/- 41nm
WM	77 +/- 8nm	126 +/- 9nm	250 +/- 35nm
MACA	35 +/- 16nm	136 +/- 10nm	231 +/- 6nm

Tableau 6 : Tableau récapitulatif du diamètre moyen de chaque population



Si $\sigma_x = \sigma_y$; $\frac{\sigma_x}{\sigma_y} = 1 \rightarrow$ particule parfaitement sphérique

Si $\sigma_x \neq \sigma_y$; $\frac{\sigma_x}{\sigma_y} \neq 1 \rightarrow$ particule ovoïde

Figure 57 : Schéma de l'ajustement anisotrope gaussien sur une plateforme non sphérique. Les paramètres σ_x et σ_y utilisés sont représenté sur la gaussienne. Le trait rouge représente la section à partir de laquelle l'ajustement gaussien est réalisé selon l'axe x, et le trait vert pour représenter l'ajustement gaussien selon l'axe y. L'ajustement gaussien : en noir le nombre de localisations par pixel et en rouge l'ajustement par la gaussienne. Le centre de la gaussienne est représenté par un trait pointillés. Le calcul permettant d'estimer la sphéricité d'une plateforme est détaillé à droite.

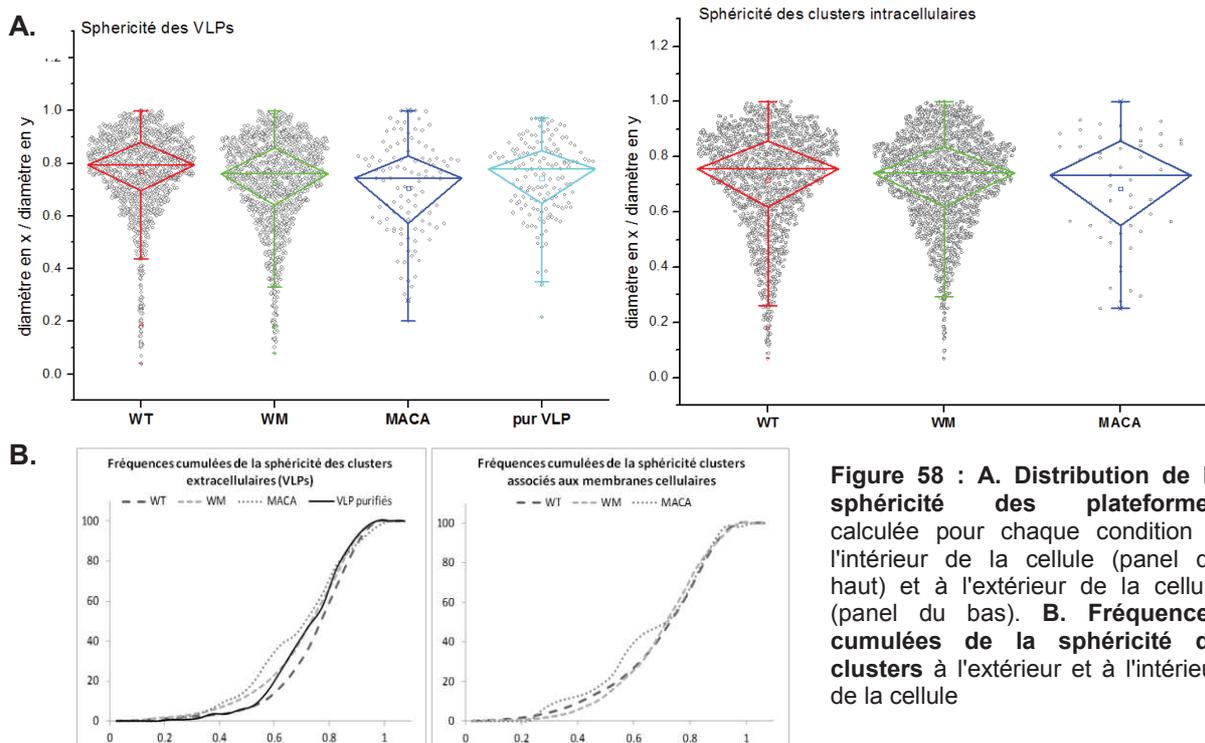


Figure 58 : A. Distribution de la sphéricité des plateformes calculée pour chaque condition à l'intérieur de la cellule (panel du haut) et à l'extérieur de la cellule (panel du bas). B. Fréquences cumulées de la sphéricité de clusters à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule

information quant à la précision de nos paramètres. Si l'on compare les proportions des différentes populations qui apparaissent lorsque l'on étudie les VLPs avec les populations des clusters de Gag-(i)mEOS2 WT, Gag-(i)mEOS2 WM ou MACA-(i)mEOS2, on remarque que la différence majeure apparaît au niveau des clusters de petite taille ($D < 100\text{nm}$). Comparés aux VLPs, les clusters de petite taille formés des protéines Gag-(i)mEOS2 WT et dérivés sont bien plus représentés.

Il est intéressant de noter qu'il n'y a aucune différence entre les clusters associés à la membrane et ceux à l'extérieur de la cellule (figure 56.B). La taille moyenne des clusters de chaque population pour chaque condition est résumée dans le tableau 6.

Environ 50% des clusters formés par Gag-(i)mEOS2 WT, Gag-(i)mEOS2 WM et MACA-(i)mEOS2 ont un diamètre D inférieur à 100nm. La taille moyenne de cette population de clusters est de 70-80nm pour Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM. Les clusters formés par MACA-(i)mEOS2 sont légèrement plus petits, avec un diamètre moyen de $50 \pm 17\text{nm}$ pour les clusters associés à la membrane cellulaire et $35 \pm 16\text{nm}$ pour les clusters situés à l'extérieur de la cellule (tableau 6).

Environ 40% des clusters formés par les protéines Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM correspondent à une taille que l'on associe à des bourgeons viraux ou des VLPs. En revanche, cette population semble légèrement moins représentée chez MACA-(i)mEOS2, qui ne représente que 30 à 35% des clusters formés. Les tailles moyennes de ces clusters sont cependant équivalentes pour chaque condition, avec un diamètre moyen de 130nm.

La population des clusters de grande taille est la moins représentée chez toutes les conditions et leurs tailles sont équivalentes, avec un diamètre moyen de 200-250nm. Les clusters de grande taille à l'extérieur de la cellule produits par les protéines MACA-(i)mEOS2 représentent 25% de la population totale. C'est une proportion plus grande en comparaison des autres conditions. Cependant, il est difficile d'apporter une interprétation cohérente à cette observation. Pour comprendre à quoi correspond cette population, il faudrait pouvoir observer ces clusters par microscopie électronique, et ainsi déterminer la forme et la structure de ces clusters.

3.2.2. La sphéricité des plateformes d'assemblage

Les plateformes d'assemblage ainsi que les VLPs ont une forme en apparence sphérique. On mesure donc le rapport entre les paramètres σ_x et σ_y comme présenté figure 57 pour vérifier cette observation.

Toutes les plateformes d'assemblage et les particules virales produites, qu'elles soient purifiées ou non présentent le même profil de distribution (figure 58.A et B). Les valeurs moyennes sont très proches pour toutes les conditions, avec une sphéricité autour de $0.7-0.8 \pm 0.2$. Il semblerait donc que les clusters de Gag-(i)mEOS2 que nous observons ont bien une forme sphéroïde.

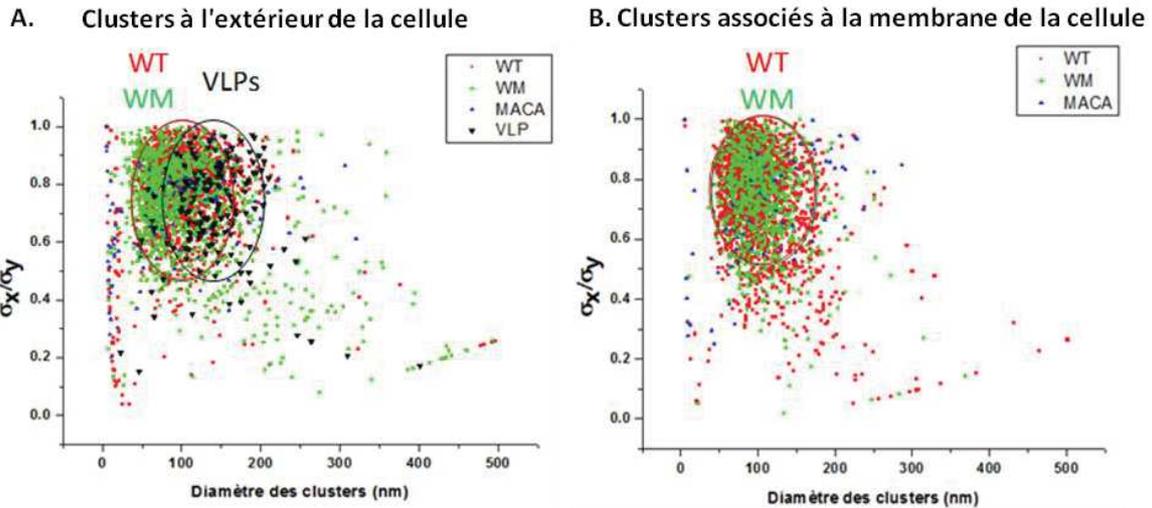


Figure 59 : Relation entre la taille des plateformes d'assemblage et leur sphéricité. A gauche sont représentés les clusters intracellulaires. A droite sont représentés les clusters extracellulaires. En abscisse la taille des clusters et en ordonnée leur sphéricité. WT : carrés rouges - WM : losanges verts - MACA : triangles hauts bleus. VLP : triangle bas noirs. Les différentes populations caractéristiques sont encerclées par un cercle de la couleur de la condition considérée.

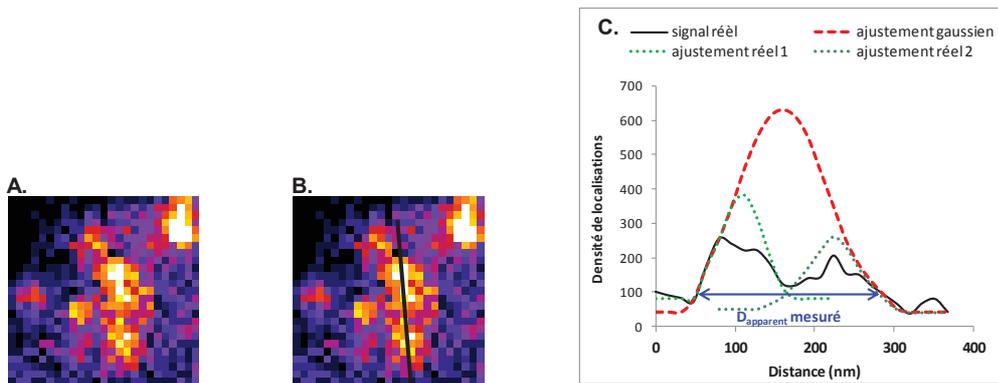


Figure 60 : Illustration d'un biais possible de l'ajustement gaussien dû à la proximité de 2 plateformes d'assemblage. A. Section de l'image de super-résolution où deux clusters sont proches l'un de l'autre. 1 pixel = 16nm. B. Image A avec la zone de l'image qui sera ajustée. C. Représentation du profil de densité de localisation par pixel issue de la section représentée en B et des ajustement gaussiens associés (en rouge : ajustement réalisé, en vert foncé et vert clair les deux pics qui auraient dû être séparés).

Si l'on considère que les deux paramètres de taille et de sphéricité sont nécessaires pour obtenir une structure virale adéquate (donc proche des VLPs purifiées), les deux paramètres doivent être mis en relation (figure 59). Nous souhaitons effectivement savoir s'il y a une relation de proportionnalité entre la taille et la sphéricité des clusters observés.

- Clusters de Gag-(i)mEOS2 à l'extérieur de la cellule (VLPs) (figure 59.A) :

Les VLPs purifiées présentent une taille globalement plus grande que les clusters extracellulaires formés par Gag-(i)mEOS2 WT et ses dérivés, avec un diamètre compris entre 70 et 150nm et une sphéricité comprise entre 0.6 et 0.9 (figure 59.A - noir). La population majoritaire des clusters de Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM se retrouve avec une sphéricité comprise entre 0.6 et 0.9 et des diamètres compris entre 60 et 170nm.

Les clusters formés par les protéines MACA-(i)mEOS2, présentent préférentiellement des clusters dont la taille et la sphéricité sont plus petites, même si quelques clusters présentent les caractéristiques des clusters de Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM.

Une population minoritaire mais non négligeable apparaît : certains clusters de Gag-(i)mEOS2 WM présentent une grande dispersion à l'extérieur de la cellule, avec une population de tailles plus grandes et de sphéricité très variable. Cette observation est en accord avec les observations de Datta et al. en 2007, mettant en évidence un phénotype irrégulier tant en taille qu'en forme des VLPs produites par Gag-(i)mEOS2 WM par microscopie électronique [Datta et al., 2007] (cf. figure 18, page 30).

- Clusters associés à la membrane cellulaire (plateformes d'assemblage) (figure 59.B) :

Les clusters associés à la membrane plasmique des cellules présentent un profil identique à celui des clusters observés à l'extérieur des cellules : la population majoritaire de Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM est composée de clusters de taille comprise entre 70 et 150nm, avec une forme sphéroïde (0.6-0.9). Les clusters formés par MACA-(i)mEOS2 sont de taille et de forme hétérogènes, même si certains clusters correspondent à ceux formés par Gag-(i)mEOS2 WT.

Les clusters associés à la membrane cellulaire formés par Gag-(i)mEOS2 WT présentent une dispersion vers des tailles légèrement plus grandes et de sphéricité plus basse. Cette observation met en évidence un biais possible de la technique : en effet, si la densité de plateformes est forte, alors la séparation des clusters entre eux sera difficile. L'ajustement gaussien peut alors considérer 2 plateformes proches comme étant une seule structure (figure 60). La conséquence est donc l'observation de structures dont la taille apparaît plus grande et de sphéricité moindre.

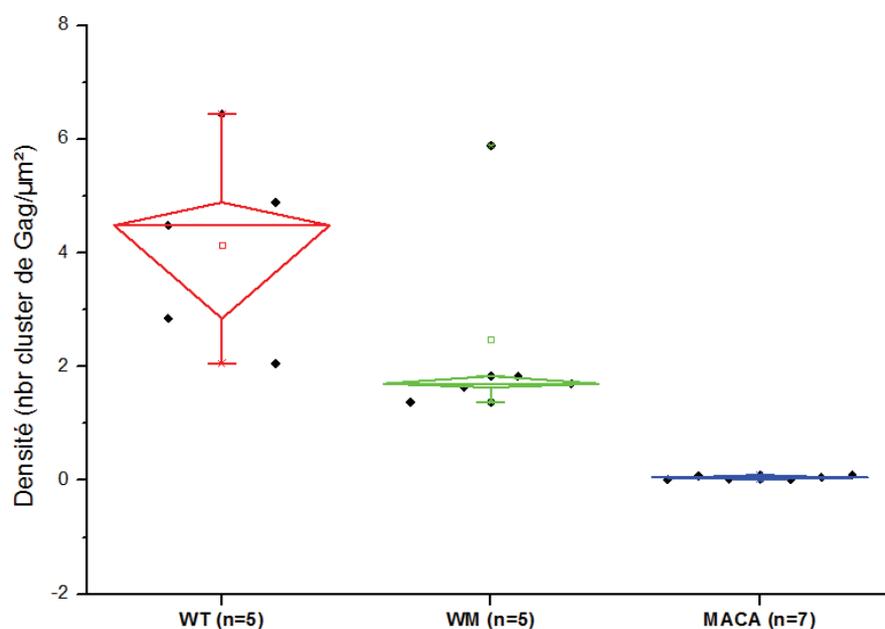


Figure 61 : Densité des plateformes d'assemblage à la membrane des cellules. WT en rouge, WM en vert, MACA en bleu. Les densités de chaque cellule sont représentées en noir.

	WT	WM	MACA	VLP purifiées
EXTRACELLULAIRE				
Diamètre moyen	101 +/-45 nm	124+/-66nm	96+/-76nm	135+/-36nm
Sphéricité moyenne	0.8+/-0.2	0.7+/-0.2	0.7+/-0.2	0.7+/-0.1
INTRACELLULAIRE				
Diamètre moyen	110+/-56nm	115+/-47nm	109+/-69nm	X
Sphéricité moyenne	0.7+/-0.2	0.7+/-0.2	0.7+/-0.2	
Densité médiane	4.5	1.7	0.1	

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des données obtenues par l'étude de la morphologie des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des Lymphocytes T.

La différence la plus significative concerne la densité de plateformes d'assemblage membranaire dans les différentes cellules. En effet, lorsque l'on compare le nombre de plateformes d'assemblage par unité de surface membranaire, on remarque que Gag-(i)mEOS2 WT forme en moyenne 4.5 plateformes/ μm^2 , soit 2.6 fois plus que Gag-(i)mEOS2 WM qui n'en forme que 1.7/ μm^2 . En ce qui concerne MACA-(i)mEOS2, comme attendu, seulement quelques plateformes sont détectables, aboutissant à 0.1 plateformes/ μm^2 , soit 45 fois moins que Gag-(i)mEOS2 WT (figure 61).

3.3. Conclusion et discussion

L'étude des plateformes d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 en Jurkat fixées par microscopie PALM/TIRF nous permet d'identifier ~200 à 500 plateformes d'assemblage par cellules qu'il est ensuite possible d'étudier individuellement. A la membrane plasmique des Lymphocytes T, Gag-(i)mEOS2 s'organise sous forme de clusters de taille variable. Nous avons distingué deux populations principales de ces clusters membranaires selon leur taille :

- des petits clusters ($D < 100\text{nm}$), que l'on associe à des multimères intermédiaires de Gag. Leur taille est d'environ 75nm et leur forme est hétérogène. Ces clusters peuvent être associés à des plateformes en cours de formation. Cependant, il est possible que la fixation induise l'agrégation de multimères membranaires, menant à l'apparition de clusters.
- des clusters denses en protéines que nous interprétons comme étant des virions de Gag-(i)mEOS2 ($100 < D < 170\text{nm}$). Leur taille est d'environ 130nm. Globalement rondes, la forme de ces plateformes d'assemblage est très homogène. Ces clusters peuvent donc être associés à des bourgeons viraux dont l'assemblage est fini et sur le point d'être libérés dans le milieu extracellulaire.

Une petite population de clusters plus grands est également détectable ($D > 170\text{nm}$). Leur forme, à l'instar des petits clusters, est hétérogène. Peu représentée à la membrane, cette population est sûrement due à un biais de l'ajustement gaussien utilisé.

Les résultats obtenus sont résumés tableau 7. Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons pu observer quant à la production de VLPs par ces différentes constructions : en effet, Gag-(i)mEOS2 WM produit deux fois moins de VLPs que le WT (26% de production virale *versus* 55% pour Gag-(i)mEOS2 WT), ce qui correspond à la diminution de densité de plateformes associées à la membrane. MACA-(i)mEOS2 ne présente que très peu de plateformes d'assemblage à la surface des cellules, induisant une incapacité à produire des VLP (13% de production virale). Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 joue un rôle important dans l'assemblage viral, et que le recrutement d'ARN semble être un élément structural important dans la formation de plateformes d'assemblage dans les lymphocytes T.

	Clusters membranaires	Diametre (nm)	Technique	cell type	observations
Malkusch 2013 <i>Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution</i>	clusters de Gag-SNAPtag	120nm	dSTORM	A3.01 T cells	Marquage Alexa647 Estimation par fonction Ripley's K
Gunzenhäuser 2012 <i>Quantitative Super-Resolution Imaging Reveals Protein Stoichiometry and Nanoscale Morphology of Assembling HIV-Gag Virions</i>	clusters de Gag-mEOS2	166+/-26nm	PALM	cos7 ou HeLa	Estimation par découpage spatial du cluster à partir de son centre
	Particule viral	Diametre (nm)	Technique	cell type	observations
Briggs 2005 <i>The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions</i>	mature	125 +/- 14nm	EM		
Briggs 2004 <i>The stoichiometry of Gag protein in HIV-1</i>	mature	119-207nm	cryo-EM		
	immature	145+/-25nm	STEM		
Briggs 2003 <i>Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores</i>	mature	134+/-11nm	cryoEM		particule 1 core
		158+/-16nm			2 cores
Pornillos 2003 <i>HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein</i>	immature GagGFP	100-200nm	EM		
Wilk et al. 2001 <i>Organization of immature human immunodeficiency virus type 1</i>	immature	133+/-17nm	cryo-EM	MT-4 cells	

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études de la morphologie des particules virales ou des plateformes d'assemblage intracellulaires de Gag. dSTORM = direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy - PALM = Photoactivable Localization Microscopy - EM = electron microscopy - STEM = Scanning transmission electron microscopy

L'équipe de S. Manley a également étudié la morphologie des clusters de Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique de cellules adhérentes par TIRF/PALM (Tableau 8) [Gunzenhäuser et al., 2012]. Dans cette étude, ils distinguent deux populations de clusters, une de petite taille et de faible densité protéique qu'ils associent à des intermédiaires d'assemblage ; et une autre plus grande et de forte densité, qu'ils associent à des virions de Gag-(i)mEOS2 sur le point de finir le processus de production virale. Ils ne considèrent que la taille moyenne des clusters les plus larges (10% les plus grands) et obtiennent un diamètre moyen de 166 ± 26 nm. Ce résultat est compris entre la taille que nous trouvons pour la population de larges clusters ($\sim 240\pm 50$ nm) et celle que nous avons associée aux virions de Gag-(i)mEOS2 ($\sim 127\pm 10$ nm). Leurs paramètres de sélection ainsi que leur méthode d'estimation du diamètre sont différents des nôtres, mais nous obtenons malgré tout des tailles du même ordre de grandeur. De même, ils décrivent la population de petits clusters comme divergeant de la forme circulaire, à l'instar de nos observations.

Nous avons estimé le diamètre moyen des VLPs purifiées à 135 ± 36 nm. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par Briggs et al. en 2004 qui montrent par microscopie électronique à balayage et à transmission (STEM) que la particule immature du VIH-1 mesure $\sim 145\pm 25$ nm de diamètre. De même, Pornillos et al. ont montré par microscopie électronique en 2003 que les VLPs composées de Gag-GFP avaient un diamètre compris entre 100-200nm. Nos résultats sont donc concordants avec ce qui a été publié précédemment. Les légères différences obtenues peuvent être dues à notre méthode d'approximation de la taille des plateformes. En effet, nous utilisons un ajustement gaussien anisotrope. Cependant, cette méthode ne prend pas en compte la forme réelle de la plateforme, ce qui peut induire un biais dans l'estimation de la taille. Par ailleurs, nous considérons le diamètre de la particule à 10% de la hauteur de la gaussienne, ce qui peut induire une sous-estimation de la taille réelle de la particule.

L'altération de domaines fonctionnels de Gag-(i)mEOS2 n'induit aucune altération phénotypique des plateformes d'assemblage observées, tant au niveau de leur taille moyenne que de leur sphéricité. Les VLPs produites par les cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 WM, situées à l'extérieur de ces cellules, présentent une population de grande taille et de forme hétérogène. Cette observation est en accord avec les observations en microscopie électronique faites par Datta et al. en 2007 mettant en évidence un phénotype irrégulier tant en taille qu'en forme des VLPs produites par Gag-WM (figure 18 - page 30).

Les interactions CA-CA (site de dimérisation de la CA) autant que les domaines C-terminaux assurent une plus grande homogénéité phénotypique. Cependant, la densité membranaire de clusters est largement impactée. Ainsi, Gag-(i)mEOS2 WM présente 2,6 fois moins de plateformes d'assemblage que Gag-(i)mEOS2 WT tandis que MACA-(i)mEOS2 n'en forme presque aucune. Ces domaines de Gag semblent donc jouer un rôle important dans le processus de formation des plateformes d'assemblage, mais pas sur la morphologie de la

plateforme si elle arrive à se développer.

Ici, nous n'avons pas mesuré la stœchiométrie des molécules de Gag au sein de chaque plateformes et virions. Il serait cependant intéressant de savoir si les domaines fonctionnels de Gag-(i)mEOS2 jouent un rôle dans le nombre de protéines recrutées au sein de ces plateformes et des VLPs qui en sont issues. En effet, ce paramètre apporterait des informations complémentaires pour la compréhension du processus d'assemblage viral. De nouvelles méthodes mathématiques sont aujourd'hui disponibles, telle que celle présentée par l'équipe de G.J Schütz permettant d'avoir accès à la capacité de clusterisation des protéines [Baumgart et al., 2016].

Cette étude confirme que la microscopie de super-résolution PALM sur cellules fixées permet de distinguer des plateformes d'assemblage individuelles dont le phénotype correspond à la morphologie connue des virus immatures. Cette observation est primordiale pour l'analyse dynamique de l'assemblage viral : grâce à notre méthode d'acquisition, nous sommes en mesure d'identifier des plateformes d'assemblage. Nous sommes donc en mesure d'étudier la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 autour de ces plateformes d'assemblage, et les fluctuations de cette dynamique menant à la formation d'un bourgeon viral.

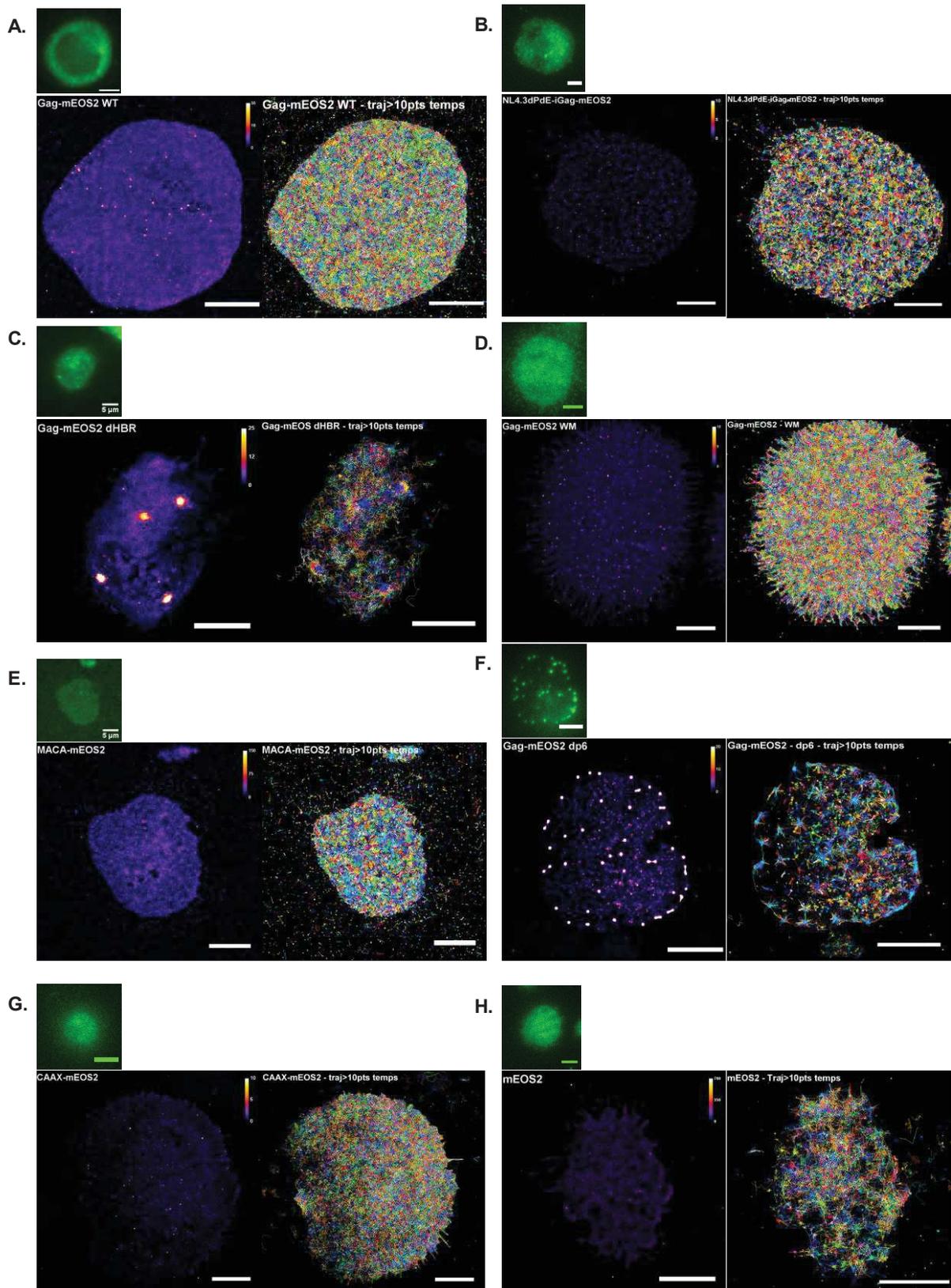


Figure 62 : Image de super-résolution des Gag-mEOS2 à la membrane des Lymphocytes T vivants et les trajectoires reconstruites analysées. En haut à gauche sont représentées les images de basse résolution en plein champ. Le panel de gauche correspond à la superposition de toutes les localisations obtenues après 26min d'acquisition. Le nombre de localisations est compris entre 10^4 et 10^7 localisations totales en fonction des conditions. L'échelle de couleur correspond au nombre de localisations par pixel. Le panel de droite correspond à la superposition de toutes les trajectoires analysables (i.e trajectoires >10 points temps) issues du suivi de protéines Gag-mEOS2 par sptPALM pendant 26min. Echelle pour chaque image = 5μm. A.Gag-mEOS WT. B.NL4.3ΔPolΔEnv-iGag-mEOS2. C.Gag-mEOS2 ΔHBR. D.Gag-mEOS2 WM. E.MACA-mEOS2. F.Gag-mEOS2 Δp6. G.CAAX-mEOS2. H.mEOS2

4. Etude de la diffusion de Gag(mEOS2)_i à la membrane plasmique des cellules T

L'assemblage viral étant un processus dynamique, nous voulons étudier les mouvements des protéines Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants dans des cellules Jurkat vivantes. Pour cela nous avons suivi ces molécules uniques par spt-PALM (single particle tracking – PALM). Cette méthode permet de suivre les trajectoires de molécules uniques en très grand nombre sur des temps variables. Ces trajectoires sont alors analysables de différentes façons. Une façon d'analyser et de quantifier la diffusion consiste en la détermination d'un coefficient de diffusion. Le coefficient de diffusion est une grandeur qui exprime l'efficacité de parcours d'une surface en un temps donné. Lors de l'analyse des trajectoires, les coefficients de diffusions D_{coef} peuvent être extraits à partir du déplacement quadratique moyen (ou MSD pour *Mean Square Displacement*). L'évolution de ce déplacement quadratique moyen en fonction du temps, (MSD(t)) possède une pente à l'origine dont la valeur est proportionnelle au coefficient de diffusion. Pour obtenir une valeur fiable, la trajectoire considérée pour obtenir le coefficient de diffusion doit être assez longue : nous étudions ici les trajectoires dont la durée est supérieure ou égale à 200ms (= 10 points temps).

Cette étude est réalisée à l'échelle de la cellule entière : nous observons la dynamique moyenne de toutes les protéines Gag-(i)mEOS2 que l'on peut suivre diffusant à la membrane plasmique des cellules T Jurkat. Nous espérons ainsi obtenir des informations concernant la mobilité de Gag-(i)mEOS2, et le rôle de ses domaines dans cette mobilité.

Afin de pouvoir comprendre quels types de mouvements nous observons, la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants est comparée à des dynamiques de référence dont la mobilité est connue :

- Une référence de protéine mono(di)mérique ancrée à la membrane :

CAAX-mEOS2 est un petit peptide de 4 acides aminés, acylé à son extrémité C-terminale [Long et al., 2001]. Il va s'ancrer dans la membrane via sa chaîne acyl et diffuser sous forme de monomère. Ce peptide, fusionné à la protéine mEOS2, nous permet de déterminer le profil dynamique d'une protéine monomérique à la membrane.

- Une référence d'immobilité :

Les VLPs produites par Gag-(i)mEOS2 WT nous permettent d'obtenir le profil dynamique des particules virales formées, signature de la fin d'un processus d'assemblage. Dans ces VLPs, les protéines Gag-(i)mEOS2 sont supposées être confinées au sein de la VLPs, et ne plus présenter de mobilité. Nous utilisons donc la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 au sein des VLPs pour mesurer à la fois l'absence de mobilité et l'erreur de positionnement des particules liée aux contraintes mécaniques de l'expérience.

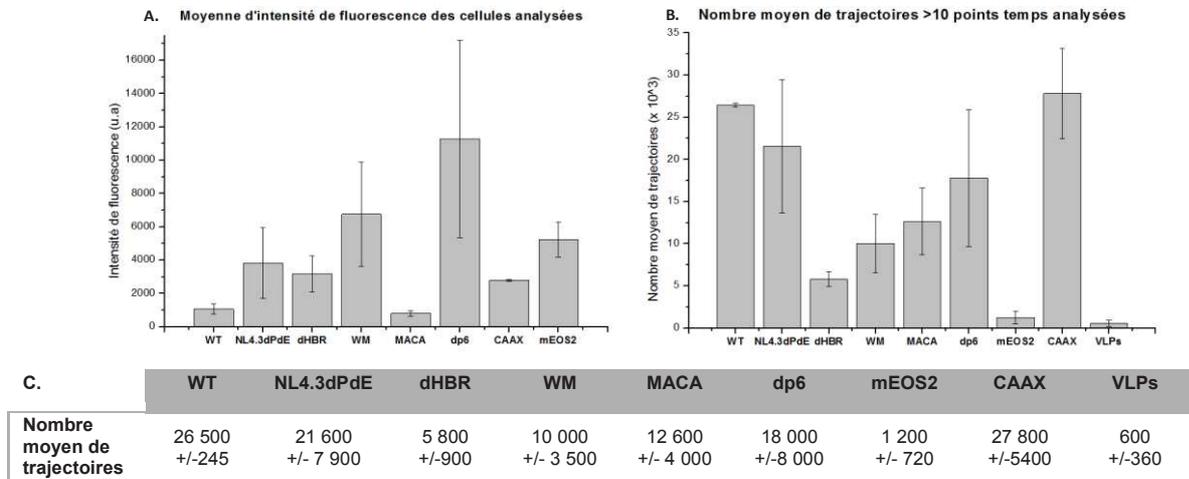


Figure 63 : A. Moyenne d'intensité de fluorescence des cellules analysées. L'intensité de fluorescence est mesurée à partir de l'image basse résolution des cellules Gag-mEOS2 après excitation à 488nm. La mesure de l'intensité est prise par ImageJ. **B. Nombre moyen de trajectoires d'une durée >200ms** par condition des cellules utilisées pour l'analyse de la diffusion de Gag à la membrane. **C. Nombre moyen de trajectoires >200ms**

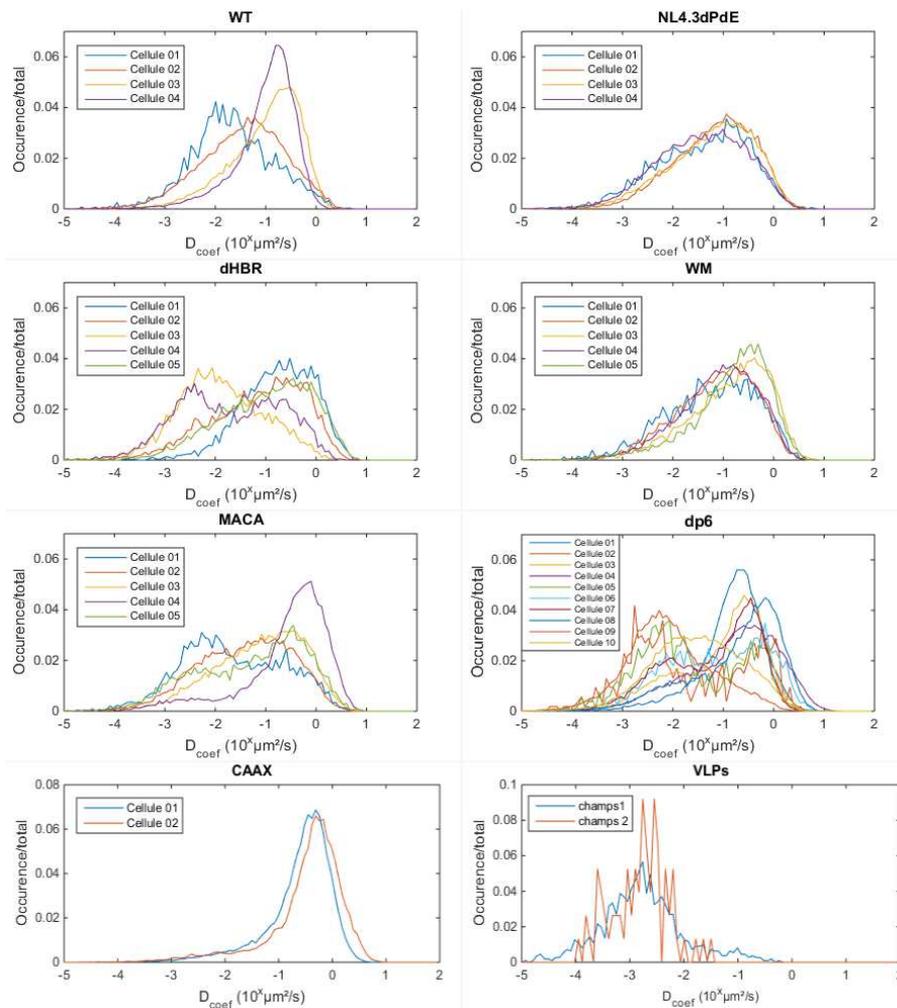


Figure 64 : Distribution des coefficients de diffusion des cellules étudiées pour chaque condition.

Les trajectoires > 10 points temps sont utilisées pour déterminer le coefficient de diffusion de chaque protéine de Gag-mEOS2 suivie. Le nombre d'occurrences pour chaque Dcoef rapporté au nombre total d'occurrences est utilisé pour élaborer la distribution des coefficients de diffusions. Les Dcoef sont compris entre 10^{-5} et $10^0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ avec un pas de $10^{0.07}$ soit $\sim 1.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. L'abscisse est en échelle logarithmique. WT: n=4cellules - NL4.3dPdE: n=4cellules - dHBR: n=5cellules - WM: n=5cellules - MACA: n=5cellules - dp6: n=10cellules - CAAX: n=2cellules - VLPs: 2 champs à l'extérieur des cellules exprimant GagWT

Les protéines Gag-(i)mEOS2 exprimées dans les Jurkats vivantes sont imagées pendant 26 min. Chaque molécule unique est localisée en effectuant une transformation par ondelettes de l'image acquise, les trajectoires sont reconstruites à l'aide d'un algorithme permettant de déterminer un coefficient de diffusion limite qui borne le déplacement maximum (Matériel & Méthodes - page 189-190).

La figure 62 représente un exemple de la somme des localisations cellulaires ainsi que toutes les trajectoires reconstruites ≥ 200 ms à partir de ces localisations pour Gag-(i)mEOS2 et ses mutants après 26 minutes d'acquisitions. On retrouve une distribution spatiale de Gag-(i)mEOS2 sous forme de clusters de densité variable sur toute la surface de la cellule. Les protéines Gag-(i)mEOS2 dHBR et Gag-(i)mEOS2 dp6 présentent de larges clusters denses en protéines. Gag-(i)mEOS2 dp6 particulièrement présente de nombreux clusters très denses dont les contours sont faibles en densité de localisations. Cette particularité induit des défauts lors de la reconstruction des trajectoires, visibles par les trajectoires en étoiles autour de ces clusters.

Le nombre de trajectoires ≥ 200 ms est variable d'une condition à l'autre (figure 63.B et C). Gag-(i)mEOS2 WT, NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 ainsi que CAAX-mEOS2 présentent en moyenne entre 20 000 et 30 000 trajectoires de plus de 200ms. Les mutants de Gag-(i)mEOS2 ne permettent pas de reconstruire autant de trajectoires. En moyenne on observe 10 à 20 000 trajectoires pour Gag-(i)mEOS2 WM, MACA-(i)mEOS2 et Gag-(i)mEOS2 dp6, et seulement 5800 pour Gag-(i)mEOS2 dHBR. Malgré ces différences, le nombre de trajectoires obtenues permettent d'obtenir une distribution de coefficients de diffusion avec un échantillonnage statistiquement suffisant pour obtenir une signature globale de la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2. Afin de les comparer directement, les occurrences des distributions pour chaque Dcoef sont normalisées par la somme de toutes les occurrences. Chaque cellule étudiée génère ainsi une distribution des coefficients de diffusion (figure 64).

Le fluorophore mEOS2 exprimé seul dans les Jurkats est une protéine cytosolique. Elle ne permet pas de reconstruire plus de 1200 trajectoires ≥ 200 ms en moyenne (de 200 à 2000 trajectoires ≥ 200 ms selon les cellules en 26 minutes). L'échantillonnage n'est donc pas statistiquement suffisant pour réaliser l'analyse dynamique avec le fluorophore.

4.1. Etude de la distribution des coefficients de diffusion de Gag-(i)mEOS2 et ses mutants

4.1.1. Les distributions des coefficients de diffusion

La figure 64 nous permet de distinguer qualitativement trois grands types de variabilité cellulaire des distributions des Dcoef en fonction des protéines étudiées.

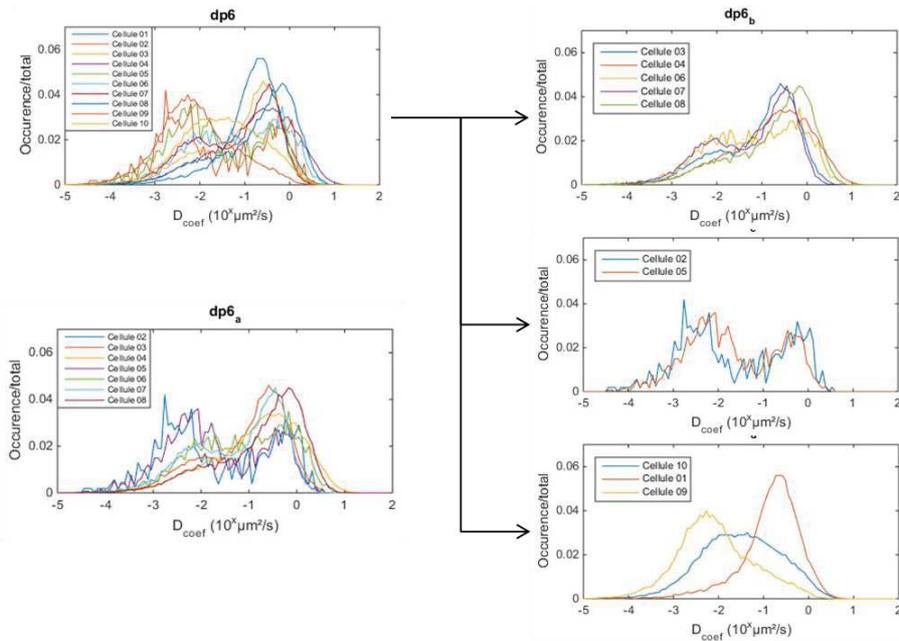


Figure 65 : Représentation des différentes populations de dynamique des cellules exprimant Gag(i)mEOS2 dp6. A gauche : toutes les distributions des 10 cellules étudiées sont représentées. **dp6_a** : distributions conservées pour réaliser l'analyse dynamique – nombre de cellules analysées 7. **dp6_b** : cellules dont le profil dynamique est identique avec une population mobile majoritaire par rapport à la population moins mobile minoritaire. **dp6_c** : cellules dont les deux populations sont en proportion équivalentes. **dp6_d** : cellules dont le profil dynamique est très distinct des autres cellules, avec soit une seule population représentée soit un profil représentatif d'une dynamique très différentes des autres cellules.

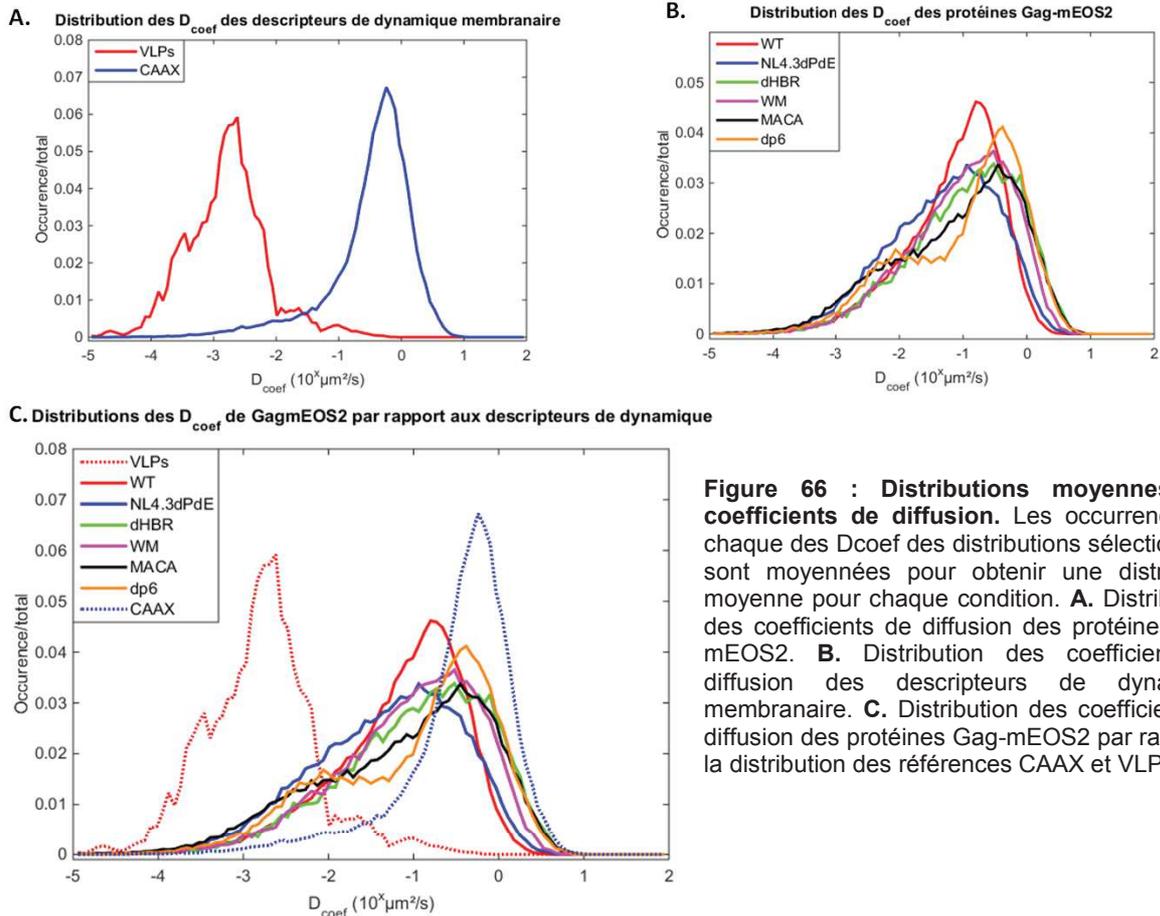


Figure 66 : Distributions moyennes des coefficients de diffusion. Les occurrences de chaque des Dcoef des distributions sélectionnées sont moyennées pour obtenir une distribution moyenne pour chaque condition. **A.** Distributions des coefficients de diffusion des protéines Gag-mEOS2. **B.** Distribution des coefficients de diffusion des descripteurs de dynamique membranaire. **C.** Distribution des coefficients de diffusion des protéines Gag-mEOS2 par rapport à la distribution des références CAAX et VLPs.

- Profils homogènes :

NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2, Gag-(i)mEOS2 WM, CAAX-mEOS2, et les VLPs ne montrent qu'une très faible variabilité dans la distribution des coefficients de diffusion d'une cellule ou d'un échantillon (VLP) à l'autre.

- Profils moyennement homogènes :

Gag-(i)mEOS2 WT semble avoir un comportement dynamique moins homogène, bien que seule la cellule C01 de cette condition (courbe bleue - panel Gag-(i)mEOS2 WT - en haut à gauche) semble nettement différente des autres.

- Profils hétérogènes :

Pour les protéines Gag-(i)mEOS2 dHBR, Gag-(i)mEOS2 dp6 ou MACA-(i)mEOS2, il semblerait que deux types de dynamiques apparaissent : une population de protéines Gag-(i)mEOS2 dont la diffusion est lente (avec un pic au sein de la distribution compris entre 10^{-2} et $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$) et une population dont la diffusion est plus rapide (avec un deuxième pic compris entre 10^{-1} et $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Cependant la proportion de chacune de ces populations peut différer nettement d'une cellule à l'autre. Certains extrêmes apparaissent, où une seule population est largement représentée au détriment de la deuxième. Les cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 Δp6 sont représentatives de ce profil hétérogène (figure 65).

4.1.2. Proportion des différentes dynamiques à la membrane

L'assemblage viral est un événement dynamique qui peut être apparenté à une multimérisation protéique. Afin de comprendre les étapes intermédiaires de ce processus grâce à l'analyse de la diffusion de chaque protéine Gag-(i)mEOS2, nous avons choisi de décomposer les distributions de coefficients de diffusion obtenues précédemment. Dans un premier temps, les distributions qui présentent un profil de dynamique proche sont moyennées (figure 66.B). Nous avons choisi de retirer de la moyenne les distributions extrêmes ou trop différentes de la majorité des distributions. Ensuite, nous avons décomposé de façon linéaire les distributions observées pour chaque protéine à l'aide des deux valeurs extrêmes de l'assemblage : la dynamique d'une protéine monomérique membranaire (CAAX-mEOS2) qui sert de référentiel de début de l'assemblage, et les dynamiques des VLPs, qui servent de référentiel de fin de l'assemblage (figure 66.A). CAAX-mEOS2 présente une distribution centrée autour de $0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ tandis que les VLPs présentent une distribution centrée autour de $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, donc une diffusion proche de l'immobilité.

De façon intéressante, la figure 66.C montre que les distributions des coefficients de diffusion de Gag-(i)mEOS2 et de ses mutants sont situées entre ces deux types de mobilité avec une certaine proportion de recouvrement des distributions. Cette observation justifie notre choix d'analyse. La décomposition linéaire permet d'extraire trois types de mobilité :

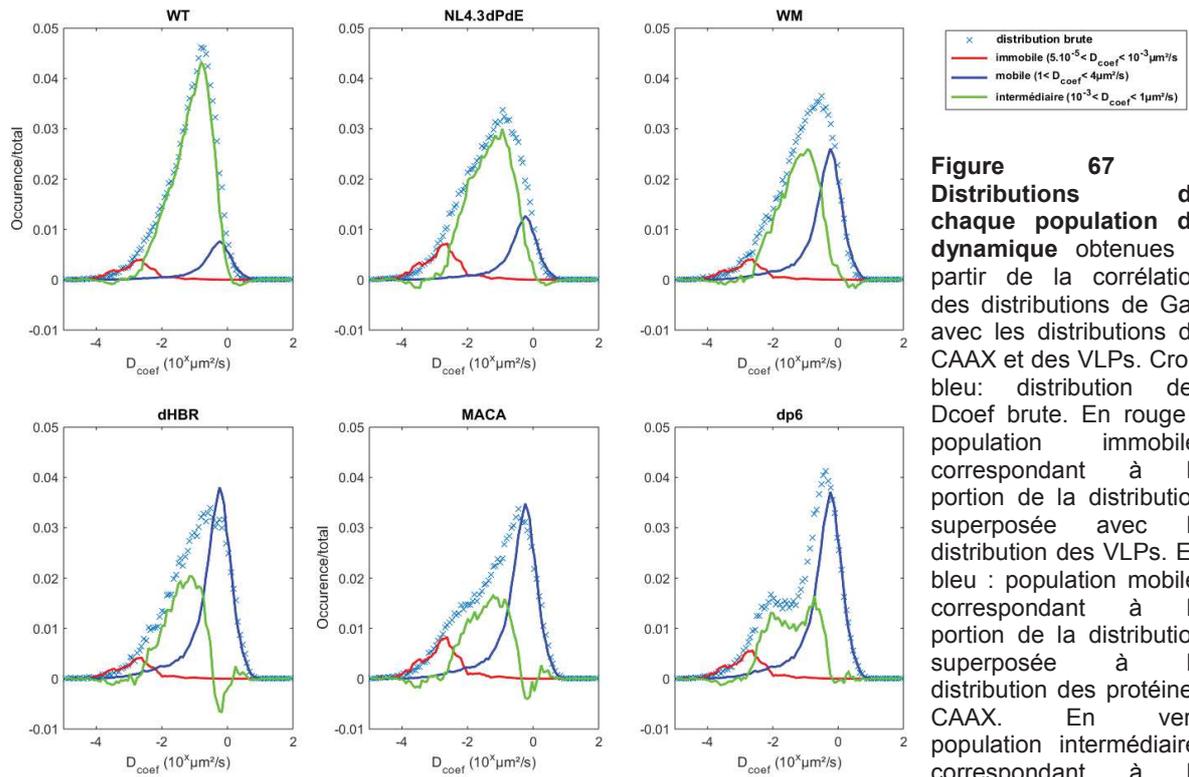


Figure 67 : Distributions de chaque population de dynamique membranaire obtenues à partir de la corrélation des distributions de Gag avec les distributions de CAAX et des VLPs. Croix bleue: distribution des Dcoef brute. En rouge : population immobile, correspondant à la portion de la distribution superposée avec la distribution des VLPs. En bleu : population mobile, correspondant à la portion de la distribution superposée à la distribution des protéines CAAX. En vert: population intermédiaire, correspondant à la portion de la distribution restante après extraction des population mobiles et immobiles.

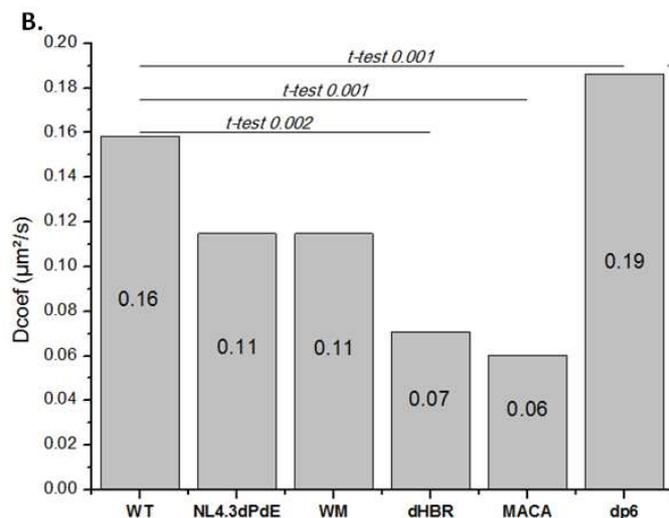
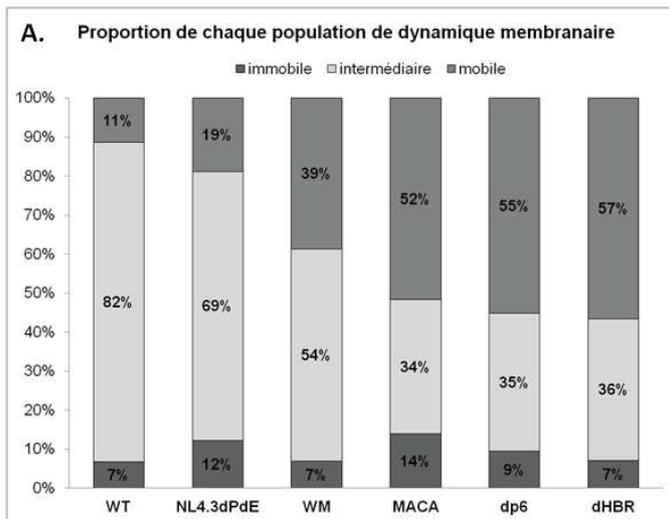


Figure 68 : A. Proportion des populations mobile, intermédiaire et immobile des protéines Gag-(i)mEOS2. Correspond au nombre d'occurrences obtenues dans chaque portion de la distribution rapporté au nombre total d'occurrences en pourcentage. B. Coefficients de diffusion de la population intermédiaire. Dcoef obtenu au niveau où la distribution de la population intermédiaire atteint le maximum d'occurrences. En gris foncé : population majoritaire - En gris clair : petite population dont le Dcoef est supérieur au Dcoef de CAAX

- une population de diffusion rapide, appelée la **population mobile**, dont les coefficients de diffusion sont compris entre 1 et $4\mu\text{m}^2/\text{s}$: ces protéines sont ancrées dans la membrane et diffusent sous forme de monomères ou dimères.
- une population de diffusion faible voire nulle, appelée la **population immobile**, dont les coefficients de diffusion sont compris entre 10^{-5} et $10^{-3}\mu\text{m}^2/\text{s}$: ces protéines ne diffusent plus et sont impliquées dans un cluster protéique dense ou une VLP sur le point d'être libérée dans le milieu extracellulaire
- une population dont la diffusion est comprise entre ces deux populations, appelée **population intermédiaire**, qui est le résiduel de la décomposition linéaire et dont les coefficients de diffusion sont compris entre 10^{-3} et $0.5\mu\text{m}^2/\text{s}$: nous considérons que ces protéines diffusent sous forme de multimères à la membrane

La proportion de chaque population obtenue par la décomposition linéaire permet de mettre en évidence le pourcentage des populations mobiles (figure 67, en bleu) et immobiles (figure 67, en rouge). La population intermédiaire correspond à la population restante (figure 67, en vert)

- Proportion de chaque populations

Les protéines Gag-(i)mEOS2 WT diffusent majoritairement sous forme de multimères, avec une population intermédiaire représentant 82% de sa population totale diffusant avec un coefficient de diffusion moyen de $0.16\mu\text{m}^2/\text{s}$ (figure 68). Les protéines NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2, exprimées avec l'ARN viral, présentent un profil de diffusion équivalent à celui de Gag-(i)mEOS2 WT seul : 69% de sa population totale diffuse sous forme de multimères avec un coefficient de diffusion d'environ $0.11\mu\text{m}^2/\text{s}$. Le recrutement spécifique de l'ARNv ne semble donc pas impacter la mobilité moyenne de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des cellules T.

Quel que soit le domaine ou le site muté au sein de la protéine Gag-(i)mEOS2, les distributions des Dcoef mettent en évidence une augmentation de la population mobile des protéines : par rapport à la proportion de protéines mono-(di)-mériques de Gag-(i)mEOS2 WT, la fraction mobile est augmentée d'un facteur 4 pour Gag-(i)mEOS2 WM et d'un facteur 5 à 6 pour MACA-(i)mEOS2, Gag-(i)mEOS2 dp6 et Gag-(i)mEOS2 dHBR. Les protéines Gag-(i)mEOS2 dHBR et MACA-(i)mEOS2 semblent également présenter une petite population de protéines qui diffusent plus vite que CAAX-mEOS2, représentée par les valeurs négatives de la population intermédiaire (figure 67 - courbe verte). Cette population n'apparaît pas dans la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 WM et Gag-(i)mEOS2 dp6.

La population intermédiaire est réduite d'un facteur 1.5 pour Gag-(i)mEOS2 WM par rapport à Gag-(i)mEOS2 WT, bien que les multimères de ces deux protéines Gag-(i)mEOS2 WT et Gag-(i)mEOS2 WM diffusent avec le même coefficient de diffusion (le test statistique t-test montre que les différences entre les distributions de leurs populations intermédiaires sont non significatives). La proportion des populations intermédiaires de Gag-(i)mEOS2 dHBR, MACA

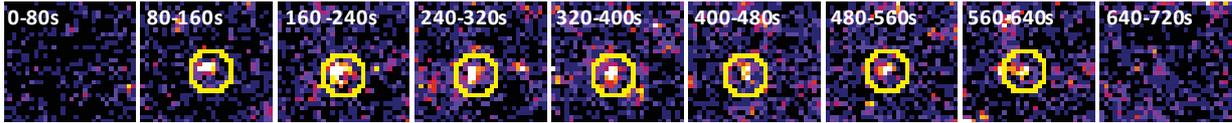


Figure 69 : Suivi d'une plateforme d'assemblage dans le temps. Une plateforme d'assemblage est sélectionnée par sa densité de localisation et suivie dans le temps. La région d'intérêt est entourée par un cercle jaune. Les trajectoires incluses dans cette région servent à mesurer les coefficients de diffusion associés à cette région. Dans cet exemple, les coefficients de diffusion seront extraits des trajectoires issues de la région entre 80 et 640 secondes.

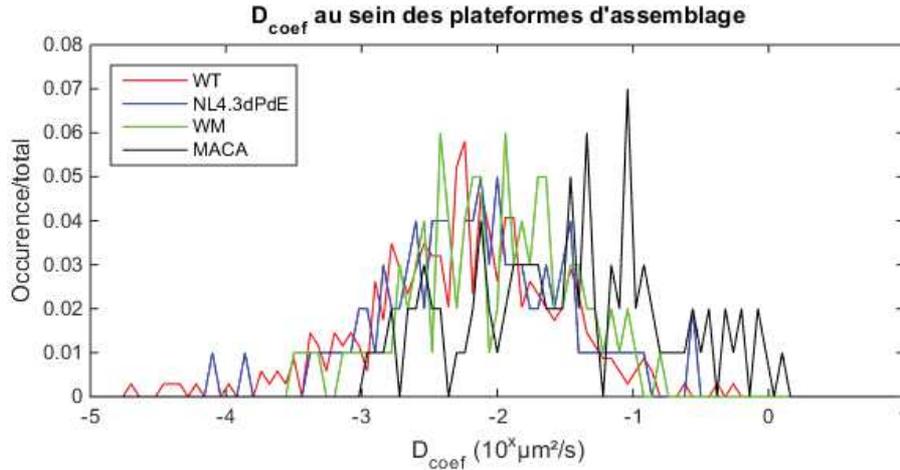


Figure 70 : Distributions de coefficients de diffusion au sein des plateformes d'assemblage. En rouge: Gag-mEOS2 WT - n=29plateformes/N=344trajectoires. En bleu: Gag-mEOS2 WT issu de pNL4.3dPdE n=111plateformes/N=873trajectoires. En vert: Gag-mEOS2 WM n=167plateformes/N=241trajectoires. En noir : MACA-mEOS2 n=10plateformes/ N=121trajectoires

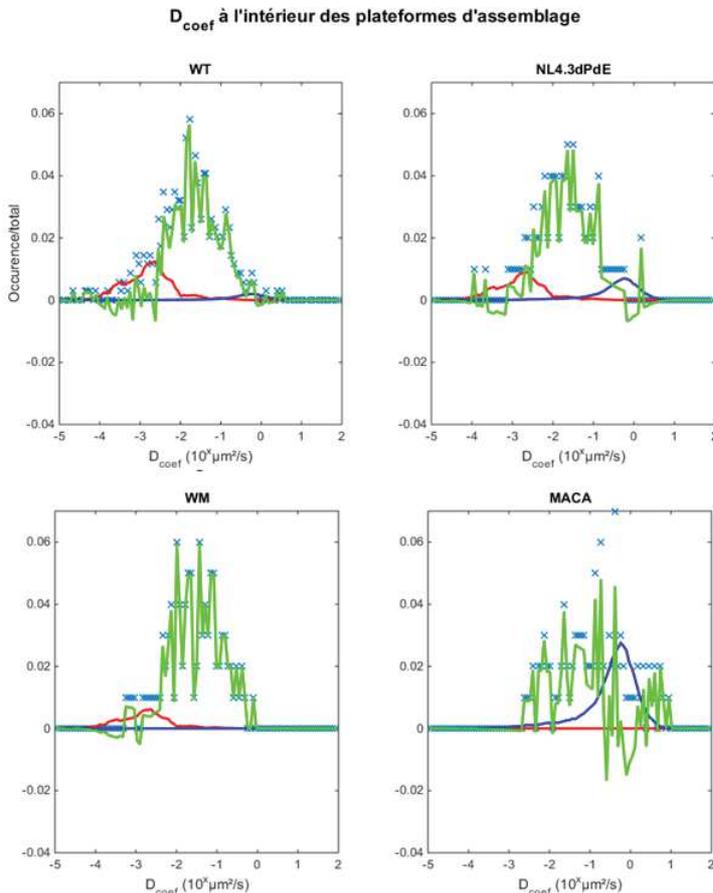


Figure 71 : Distributions de chaque population de dynamique de Gag au sein des plateformes d'assemblage
Croix bleues: distribution brute des Dcoef.
En rouge : population immobile. En bleu : population mobile. En vert: population intermédiaire.

-(i)mEOS2 et Gag-(i)mEOS2 dp6 est réduite d'un facteur 3, et les coefficients de diffusion associés sont significativement différents (t-test<0.05).

Gag-(i)mEOS2 dp6 présente 2 populations au sein de sa population intermédiaire : une population majoritaire diffusant avec le même ordre de grandeur que GagWT à $0.19\mu\text{m}^2/\text{s}$ et une deuxième population, minoritaire, diffusant à $0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$. Nous supposons que cette population de diffusion lente ($D_{\text{coef}}=0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$) correspond aux clusters denses en protéines que nous avons pu observer en image de super-résolution (figure 62). Von Schwedler et al. ont montré par microscopie électronique que les bourgeons viraux formés par les protéines Gag mutées pour supprimer le recrutement des complexes ESCRT s'accumulent à la membrane, la scission du cou du bourgeon viral n'étant plus réalisée [Von Schwedler et al., 2003 - figure 21 de l'introduction]. Il est possible que les clusters denses que nous observons à la membrane des Jurkats soient ces bourgeons viraux, dont l'assemblage viral est fini mais qui ne peuvent pas être libérés dans le milieu extracellulaire. Si cette hypothèse est avérée, cette observation nous permet d'avoir un contrôle supplémentaire : il semblerait que l'on observe ici la mobilité des bourgeons viraux dont l'assemblage est terminé mais qui ne sont pas libérés dans le milieu extracellulaire. Le D_{coef} correspondrait à la mobilité d'une particule virale toujours attachée à la membrane plasmique. Un bourgeon viral formé à la membrane plasmique présenterait ainsi une diffusion membranaire de $0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$ avant d'être libéré dans le milieu extracellulaire par un processus ESCRT-dépendant. Par ailleurs, nous n'observons pas ce type de structures chez Gag-(i)mEOS2 WT ou Gag-(i)mEOS2 WM, alors que l'on sait qu'ils peuvent produire des VLPs. Cette observation suggère que, dans notre système d'observation, les VLPs produites par Gag-(i)mEOS2 sont libérées dans le milieu extracellulaire.

De façon surprenante, la population immobile n'est pas affectée par les mutations de Gag-(i)mEOS2. Cependant, cette étude des variations de distribution des coefficients de diffusion en fonction des différents mutants a été conduite indépendamment de l'environnement immédiat des protéines suivies. Notre but étant de déchiffrer l'assemblage à partir des modifications de la dynamique des molécules impliquées dans un processus d'assemblage viral, nous avons décidé d'étudier la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 au sein des plateformes d'assemblage.

4.2. Les distributions des coefficients de diffusion de Gag-(i)mEOS2 au sein d'une plateforme d'assemblage

Les images de super-résolution représentant la densité de localisation par pixel sont utilisées pour sélectionner les plateformes d'assemblage. Ces images sont découpées par intervalles de 80 secondes. On obtient ainsi 20 images dont chacune représente la somme des localisations accumulées pendant 80 secondes. Les plateformes d'assemblage sont détectées grâce à leur densité de localisations et suivie dans le temps (figure 69). Une région d'intérêt est réalisée pour délimiter la plateforme. Les coefficients de diffusion sont extraits des trajectoires dont la durée est supérieure ou égale à 200ms et dont au moins 90% de la trajectoire est incluse

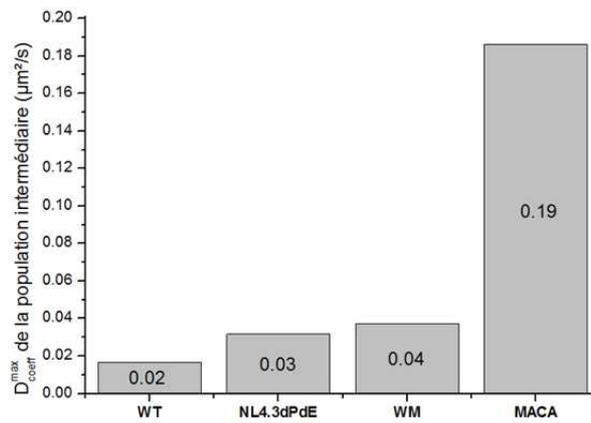
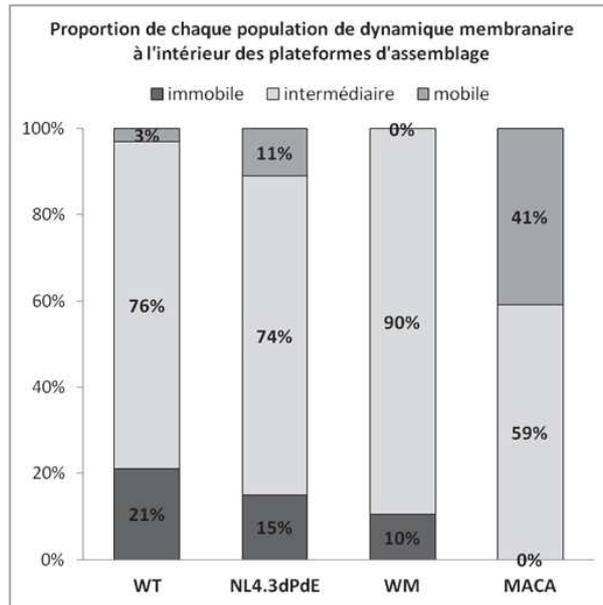


Figure 72 : A. Proportion de chaque type de dynamique à l'intérieur des plateformes d'assemblage. B. Dcoef des populations intermédiaires de Gag à l'intérieur des plateformes.

dans la région d'intérêt. La mesure du coefficient de diffusion est réalisée durant le temps de résidence de la plateforme d'assemblage.

Les distributions moyennes obtenues pour chaque population sont représentées figure 70. L'analyse est identique à celle réalisée précédemment (figure 71). La distribution des Dcoef montre que les protéines Gag-(i)mEOS2 WT sont principalement immobiles ou avec une diffusion lente à l'intérieur des plateformes d'assemblage (figure 72): 97% (76 + 21%) des protéines diffusent avec un coefficient inférieur ou égal à $0.02\mu\text{m}^2/\text{s}$. La distribution de NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 est similaire, avec 89% (74+15%) des protéines qui diffusent avec un coefficient de diffusion inférieur à $0.03\mu\text{m}^2/\text{s}$ au sein des plateformes d'assemblage. De même, la totalité des protéines Gag-(i)mEOS2 WM impliquées dans une plateforme d'assemblage présentent une diffusion lente ou immobile, avec un Dcoef inférieur ou égal à $0.04\mu\text{m}^2/\text{s}$.

L'absence des domaines C-terminaux de Gag modifie le profil dynamique à l'intérieur des plateformes : la population immobile est totalement absente et 59% des protéines MACA-(i)mEOS2 diffusent avec un coefficient de diffusion de $0.18\mu\text{m}^2/\text{s}$. La population restante correspond à des protéines diffusant sous forme de monomères à la membrane. L'étude des coefficients de diffusion des protéines MACA-(i)mEOS2 au sein des plateformes d'assemblage est biaisée du fait de la taille des plateformes d'assemblage formées en cellules vivantes. En effet, la taille de ces plateformes en image de super-résolution est inférieure ou équivalente à la taille d'un pixel de l'image brute d'acquisition. Afin de pouvoir extraire les coefficients de diffusion autour de la plateforme d'assemblage, nous avons été contraints d'utiliser une région d'intérêt plus grande que la taille de la plateforme, et ainsi considérer un espace où la dynamique des protéines MACA-(i)mEOS2 présente une mobilité plus grande. Cette contrainte induit une surestimation de la proportion de protéines mobiles dans le champ considéré. Une population immobile est pourtant observée lorsque l'on considère la dynamique des protéines MACA-(i)mEOS2 sur l'ensemble de la surface membranaire des cellules. Le choix des plateformes d'assemblage formées par MACA-(i)mEOS2 uniquement grâce à leur densité de localisations n'est ainsi peut être pas un critère suffisant pour sélectionner une plateforme d'assemblage.

4.1. Conclusion et discussion

Nous souhaitons décrire la signature de la dynamique d'assemblage des protéines Gag-(i)mEOS2 à l'échelle de la cellule grâce à la distribution des coefficients de diffusion de ces protéines. Gag-(i)mEOS2 semble diffuser principalement sous forme de multimères, avec un coefficient de diffusion de l'ordre de $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$. Au sein d'une plateforme d'assemblage, les protéines Gag-(i)mEOS2 diffusent très lentement, avec un coefficient de diffusion inférieur ou égal à $0.02\mu\text{m}^2/\text{s}$. La dynamique des protéines NL4.3dPdE- Gag-(i)mEOS2 est identique à celle des protéines Gag-(i)mEOS2 WT. La présence d'ARNv ne semble donc pas changer la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique.

Le défaut d'assemblage induit par la mutation du site de dimérisation de Gag-(i)mEOS2 au sein de la capsid (Gag-(i)mEOS2 WM) ou la délétion des domaines C-terminaux (MACA-(i)mEOS2), semble induire l'augmentation d'un facteur 4 à 5 de la fraction monomérique de ces protéines à la membrane. Au sein des plateformes d'assemblage formées, la dynamique de Gag-(i)mEOS2 WM est identique au Gag-(i)mEOS2 WT, contrairement aux protéines MACA-(i)mEOS2 dont la dynamique apparaît plus rapide.

Les différences de dynamique observées avec MACA-(i)mEOS2, ainsi que le peu de protéines que l'on peut localiser en PALM, suggèrent que MACA-(i)mEOS2 peut interagir avec la membrane mais ne peut pas rester durablement en interaction avec elle. Cette observation est en accord avec les résultats précédents mettant en avant la densité quasi nulle de plateformes d'assemblage détectables à la membrane des cellules exprimant MACA-(i)mEOS2. Ceci suggère que les protéines MACA-(i)mEOS2 peuvent former des clusters de protéines d'une certaine densité locale mais qui n'aboutissent que rarement à la formation d'une plateforme d'assemblage.

Les dynamiques que nous observons sont en accord avec ce qu'a montré l'équipe de Lippincott-Schwartz en 2014. Ils ont étudié par spt-PALM/TIRF la dynamique de Gag-(i)mEOS2 à la membrane des 293T, et l'impact de micro-ARN venant interagir avec la protéine Gag-(i)mEOS2 dans cette dynamique [Chen et al., 2014]. Ils ont estimé que Gag-(i)mEOS2 diffusait à $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ à la membrane tandis que leur mutant Gag-(i)mEOS2 ΔNC diffusait à $0.56\mu\text{m}^2/\text{s}$. Dans notre étude, nous avons déterminé que 82% des protéines Gag-(i)mEOS2 WT diffusaient à $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ tandis que 52% des protéines MACA-(i)mEOS2 diffusaient à $0.6\mu\text{m}^2/\text{s}$, à l'instar de Gag-(i)mEOS2 dp6 et Gag-(i)mEOS2 dHBR. Que ce soit à la membrane des lymphocytes T CD4⁺ ou à la membrane de cellules modèles type 293T, la diffusion membranaire de Gag semble donc identique. De plus, la suppression du site de recrutement des ARNs induit des changements importants dans la dynamique de Gag-(i)mEOS2. L'ARN semble donc être un facteur majeur, quelque soit le type cellulaire étudié.

Il est intéressant de noter que leur construction de Gag-(i)mEOS2 est celle issue de pNL4.3dPdE, identique à la notre. Dans leur étude, ils ont exprimé NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 et NL4.3dPdE-Gag (sans fluorophore) à un ratio de 1:3 pour s'affranchir de l'impact du fluorophore dans la multimérisation de Gag. Dans notre système cellulaire, cette approche est techniquement complexe. Nous n'avons donc pas exprimé de protéine Gag non couplée au fluorophore. Pourtant, la mobilité que nous déterminons est identique à celle déterminée par Chen et al.

Jouvenet et al. ont étudié en 2011 la dynamique d'encapsidation de l'ARNv en cellule vivante par microscopie TIRF via l'observation de l'ARNv couplé à la GFP en présence de Gag. Leurs résultats suggéraient qu'un défaut de multimérisation conduit au désassemblage des complexes membranaires Gag/ARNv [Jouvenet et al., 2011]. Les résultats que nous obtenons

avec MACA-(i)mEOS2 semblent être en accord avec cette observation. L'ARN, qu'il soit cellulaire (comme c'est le cas de Gag-(i)mEOS2 WT seule) ou viral (comme pour NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2), semble jouer un rôle majeur dans la stabilité de Gag à la membrane et dans sa dynamique membranaire.

Lorsqu'une plateforme d'assemblage est formée, la diffusion de Gag-(i)mEOS2 WM apparaît identique au Gag-(i)mEOS2 WT. La dimérisation de la CA de Gag-(i)mEOS2 semble donc jouer un rôle moins crucial que l'ARN dans la dynamique des protéines Gag-(i)mEOS2 à la membrane ou, du moins, dans la stabilité de la protéine à la membrane. Pourtant, nous avons vu que la densité de plateformes formées est près de 2.6 fois plus faible pour Gag-(i)mEOS2 WM par rapport au Gag-(i)mEOS2 WT, et que la production de VLPs était également réduite d'un facteur 2. L'augmentation de la fraction mobile de Gag-(i)mEOS2 WM ne permet pas d'expliquer ces différences importantes.

L'étude de la dynamique à partir des fonctions MSD(t) se base sur l'analyse statistique des trajectoires. Si cette méthode permet de décrire un comportement général ou une tendance dynamique, énormément d'informations sont perdues. Par exemple, si une protéine change de comportement pendant le laps de temps où elle est imagée, la fonction MSD(t) ne permettra d'extraire qu'un seul coefficient de diffusion. Par ailleurs, la contrainte majeure de cette étude est la longueur des trajectoires, car il est nécessaire de suivre la protéine pendant un temps assez long pour avoir accès à une analyse fiable. Ainsi, si cette méthode est un outil adapté à certains systèmes biologiques, cette démarche nous amène à supprimer des informations primordiales pour comprendre la dynamique d'assemblage de Gag à la membrane.

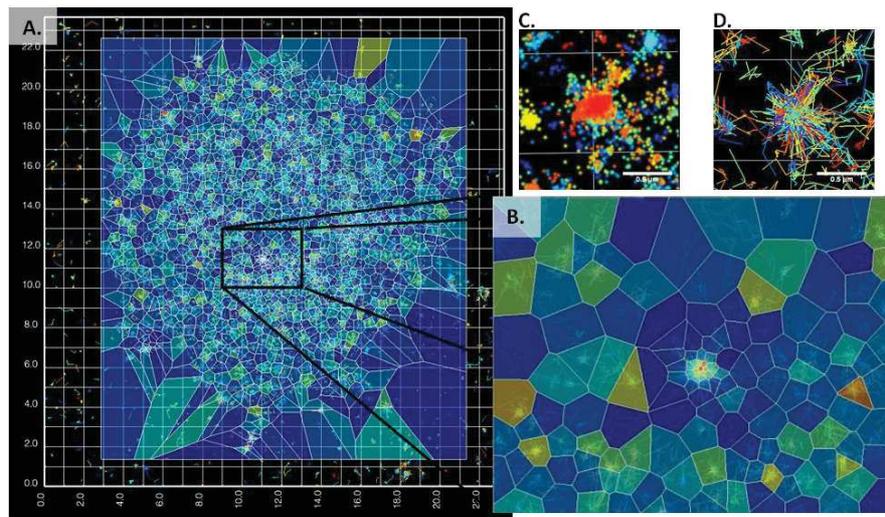


Figure 73: Partitionnement spatial de la surface cellulaire. **A. Cartographie de la cellule entière.** Le maillage est défini selon une tessellation de Voronoï avec pour critère de contenir au moins 10 localisations par zone. Chaque zone est inférée pour obtenir l'énergie potentielle, la directivité de la force et la diffusivité des protéines. **B. Partitionnement spatial d'une région contenant une plateforme d'assemblage.** La plateforme d'assemblage est située au centre de l'image. Dense en localisations, le maillage est plus resserré avec un nombre plus grand de zones au niveau de la plateforme d'assemblage. Les couleurs correspondent au nombre de localisations par zone (en bleu: minimum - en rouge maximum) **C. Superposition des localisations de la plateforme d'assemblage** visible en B. Les couleurs des localisations correspondent au temps t auquel elles sont apparues. Echelle: $0.5\mu\text{m}$. **D. Trajectoires reconstruites** à partir des localisations présentées en C. Echelle: $5\mu\text{m}$.

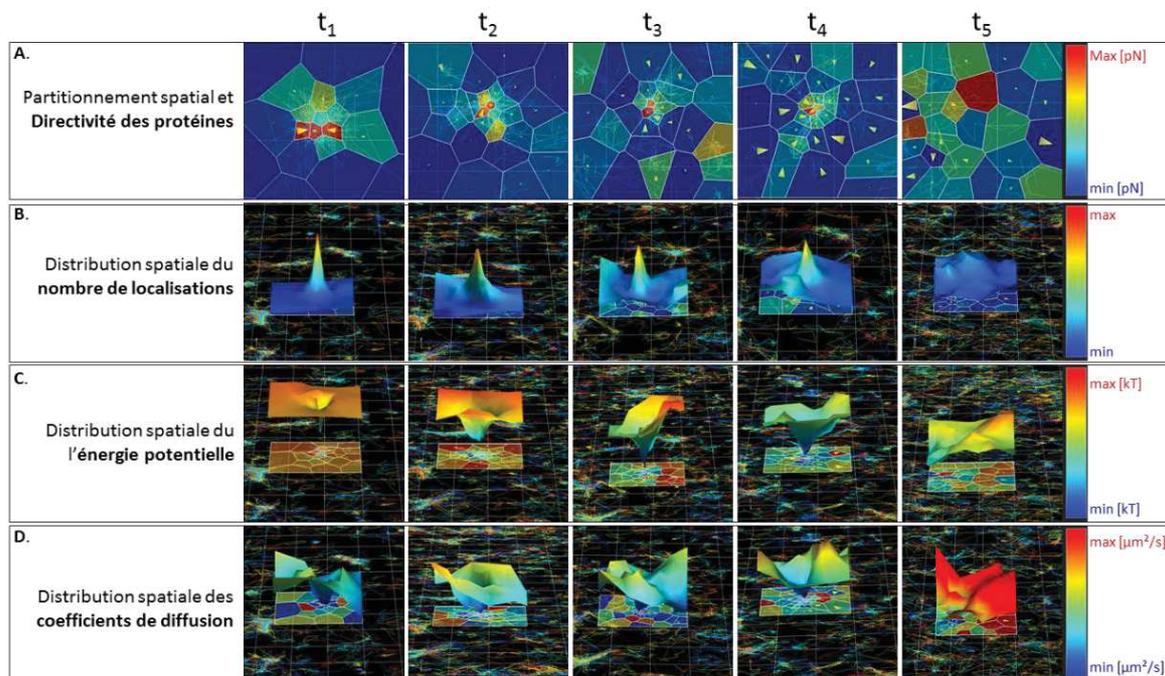


Figure 74: Suivi des paramètres obtenus par l'analyse des trajectoires grâce à l'équation de Langevin dans le temps et l'espace. Les données de super-résolution sont découpées par intervalles de 200sec pendant 10 000 secondes. Sélection d'une région d'intérêt contenant une plateforme d'assemblage. L'image des trajectoires est représentée sous chaque tracé. Le quadrillage est calibré à $1\mu\text{m}$ de côté. Les valeurs de calibration spatiale en gras signalent une valeur aberrante. **A. Partitionnement spatial et évolution de la composante force** de chaque carte. Les couleurs représentent la norme du vecteur Force et les flèches jaunes dans chaque zone la direction et le sens du mouvement des protéines Gag. **B. Evolution du nombre de localisations.** Bleu: minimum de localisations - rouge 60-100localisations. **C. Evolution de l'énergie potentielle.** **D. Evolution de la diffusivité des protéines Gag.**

5. Etude du processus de formation des bourgeons viraux dans le temps et l'espace

L'analyse des trajectoires par la simple approche diffusive ne nous a pas montré de résultats significativement différents à la proximité des plateformes d'assemblage. Même si les différents mutants ont un comportement moyen différent, ces résultats ne nous donnent qu'une vision globale de leurs rôles respectifs durant l'assemblage. Nous avons donc décidé d'analyser l'ensemble des mouvements moléculaires individuels par une autre approche. Dans cette approche, les mouvements de Gag-(i)mEOS2 ne sont plus considérés comme étant exclusivement diffusif, mais nous supposons désormais que l'environnement membranaire est caractérisé par 2 grandeurs qui sont des fonctions de l'espace : une diffusion (D) et une énergie potentielle (E). Dans ce contexte, la protéine est associée à un marcheur aléatoire dont le mouvement est régi par l'équation de Langevin (figure 43 - page 82).

Afin d'analyser les trajectoires à l'aide de cette équation, nous avons collaboré avec le Dr. JB Masson et le Dr. M. Dahan. Le Dr. JB Masson a développé une méthode d'analyse des trajectoires basées sur l'inférence Bayésienne (figure 42 - page 82) [Turkcan et al. 2012] qui a été appliquée avec succès à l'étude de la dynamique de récepteur neuronal [Masson et al., 2014]. Plus récemment, cette méthode a été retranscrite au sein d'un logiciel en accès libre (Inférence MAP) qui permet de cartographier des paysages d'énergie et de diffusion des protéines membranaires à partir de l'imagerie de molécules uniques à haute densité [El Beheiry et al., 2015]. C'est à l'aide de ce logiciel que nous avons traité nos données (Matériel & Méthode page 190-191).

Dans un premier temps, les protéines Gag-(i)mEOS2 sont localisées par un ajustement gaussien, augmentant ainsi la précision de localisations. Comme précédemment, les localisations obtenues sont recalées à l'aide d'une bille statique de $0.2\mu\text{m}$. Les trajectoires sont ensuite reconstruites à partir d'une distance maximum autorisée pour reconnecter deux localisations (algorithme développé par le Dr. Sergé [Sergé et al., 2008]).

La surface de la cellule est ensuite cartographiée (figure 73) grâce à un diagramme de Voronoï. Ce partitionnement spatial repose sur le découpage de la surface de la cellule en un maillage établi sur la densité de localisations des particules. Cela signifie que la densité spatiale du maillage (i.e., grandeur proportionnelle à la distance entre chaque centre des mailles) augmente avec la densité de localisations. La carte de la membrane cellulaire ainsi obtenue est donc spécifique du système considéré.

L'analyse des trajectoires issues de chaque zone est alors effectuée par inférence Bayésienne, qui considère la fraction des trajectoires appartenant à chaque zone, mais aussi leur continuité sur les zones adjacentes.

Cette approche permet d'extraire différents paramètres pour chaque zone (figure 74) :

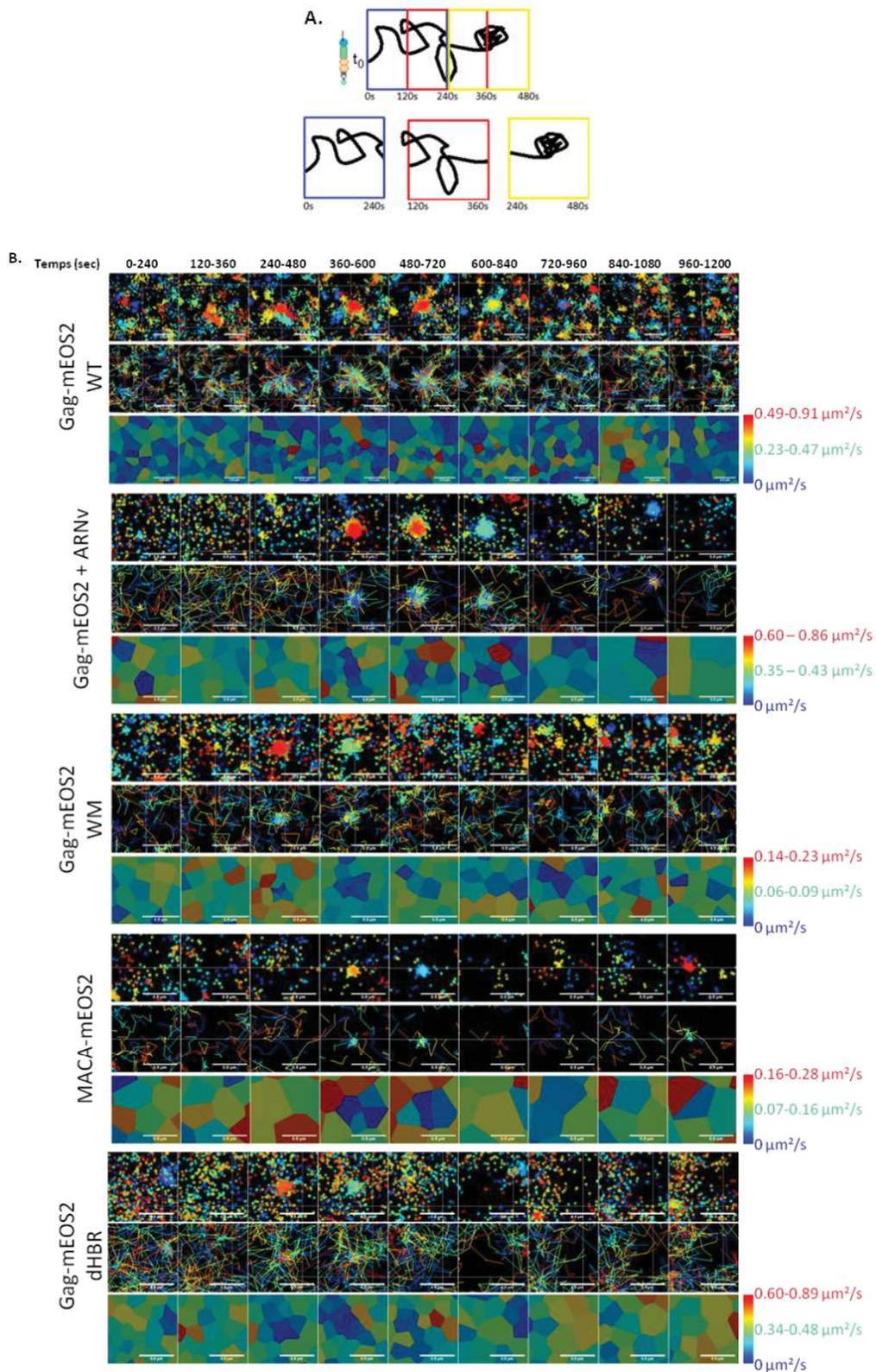


Figure 75: Suivi de la formation d'une plateforme d'assemblage au cours du temps. A. Schéma du découpage temporel Les images de super-résolution (localisations et trajectoires) sont découpées en fenêtres temporelles avec un intervalle de temps de 240sec (4min), avec un chevauchement de 120sec (2min). En noir, la trajectoire de la protéine Gag. Les carrés représentent les fenêtres de temps (en bleu : de 0-4min ; en rouge : de 2-6min ; en jaune : de 4-8min). **B. Suivi d'une plateforme d'assemblage des protéines Gag de sa formation à sa disparition.** L'intervalle de temps est noté en haut de la figure. La région d'intérêt sélectionnée mesure $1\mu\text{m}^2$ (quadrillage de $1\times 1\mu\text{m}$). Toutes les conditions sont représentées de la même manière : la première ligne correspond à la superposition des localisations pendant 4 minutes. La deuxième ligne à la superposition des trajectoires reconstruites à partir des localisations sus-présentées. La dernière ligne représente la cartographie en deux dimensions des coefficients de diffusion associés à chaque zone du maillage (échelle de couleur à droite).

- la **diffusivité des protéines D**
- la **force \vec{F}** , permet de déterminer les effets dynamiques qui agissent sur les protéines Gag-(i)mEOS2. C'est un vecteur dont le sens et la direction indiquent l'orientation du mouvement des protéines Gag-(i)mEOS2. La magnitude de la force permet de quantifier ces effets (norme du vecteur).
- l'**énergie potentielle E**, correspond à l'énergie que possède un corps en vertu de son emplacement dans un champ de force. L'énergie potentielle permet d'identifier des domaines où ces protéines sont soit piégées (puits énergétiques), soit exclues (barrières énergétiques).

Une façon d'interpréter la valeur de cette énergie dans le cas d'un piège énergétique (ou puits de potentiel), est de la voir comme un indice de confinement. Ce confinement reflète la partition de l'objet entre le piège et l'extérieur du piège (c'est à dire la différence d'énergie ΔE entre la périphérie E_{ext} et le centre du puits E_{int}). Plus la valeur absolue de cette énergie est grande, plus le confinement est grand, et donc plus la probabilité qu'une protéine sorte du domaine considéré est faible.

Il est ensuite possible d'établir des cartes de la valeur de ces paramètres, qui donne la valeur moyenne de chaque paramètre dans la maille du réseau défini par le diagramme de Voronoï.

5.1. Etude de la capacité de Gag-(i)mEOS2 à générer un champs de force lors de l'assemblage viral

5.1.1. Le suivi de la formation d'une plateforme d'assemblage

Afin d'étudier la formation d'un bourgeon viral et la dynamique d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 à la membrane, les variations spatiales et temporelles de ces différents paramètres sont étudiées autour d'une plateforme d'assemblage.

- Découpage temporel et critères de sélection des plateformes d'assemblage

Afin de suivre la dynamique de l'assemblage, il est nécessaire de produire un ensemble temporel de cartes de diffusion et/ou d'énergie. La mise au point de ce découpage temporel est particulièrement important. En effet, la fiabilité du calcul d'inférence est limitée par le nombre de localisations par zone : si le découpage temporel est trop petit, alors le nombre de localisations par zone du maillage sera insuffisant et ne permettra pas d'obtenir une estimation précise des paramètres extraits.

Dans cette première approche, l'intervalle choisi est de 240 secondes, avec un recouvrement de 120 secondes afin de préserver une continuité temporelle de l'analyse (figure 75.A). Grâce à ce découpage, nous pouvons voir l'apparition d'une plateforme d'assemblage et suivre son évolution dans le temps jusqu'à sa disparition (figure 75.B). Nous pouvons d'ors et déjà observer des différences apparentes entre les différentes protéines Gag-(i)mEOS2 WT et

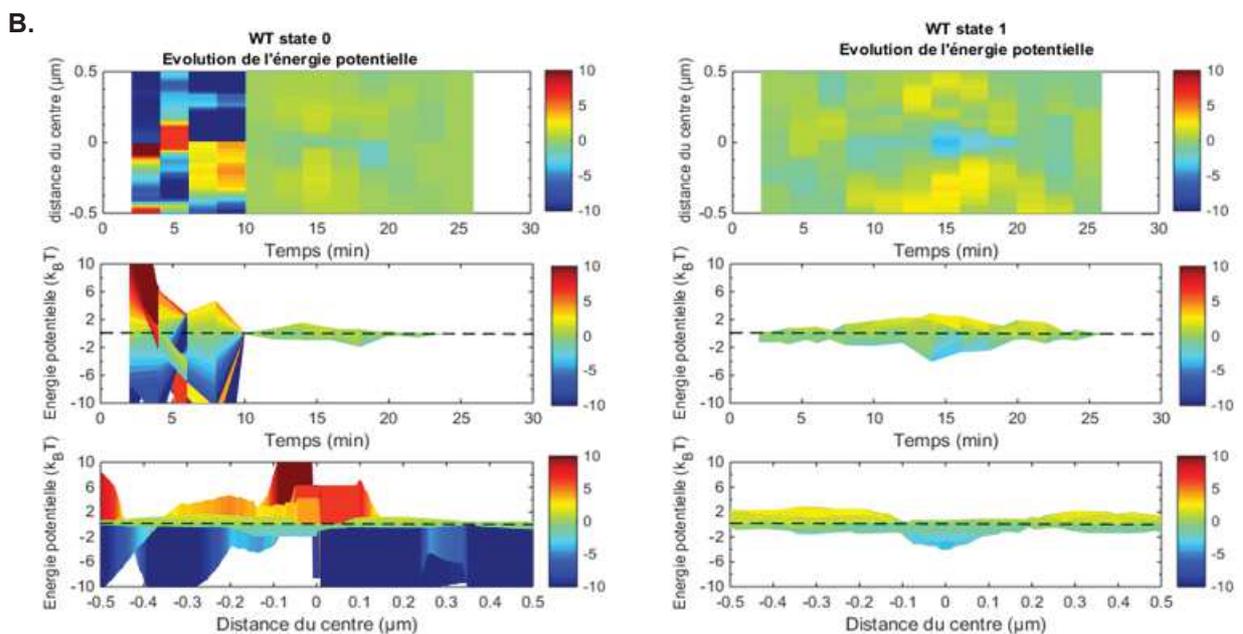
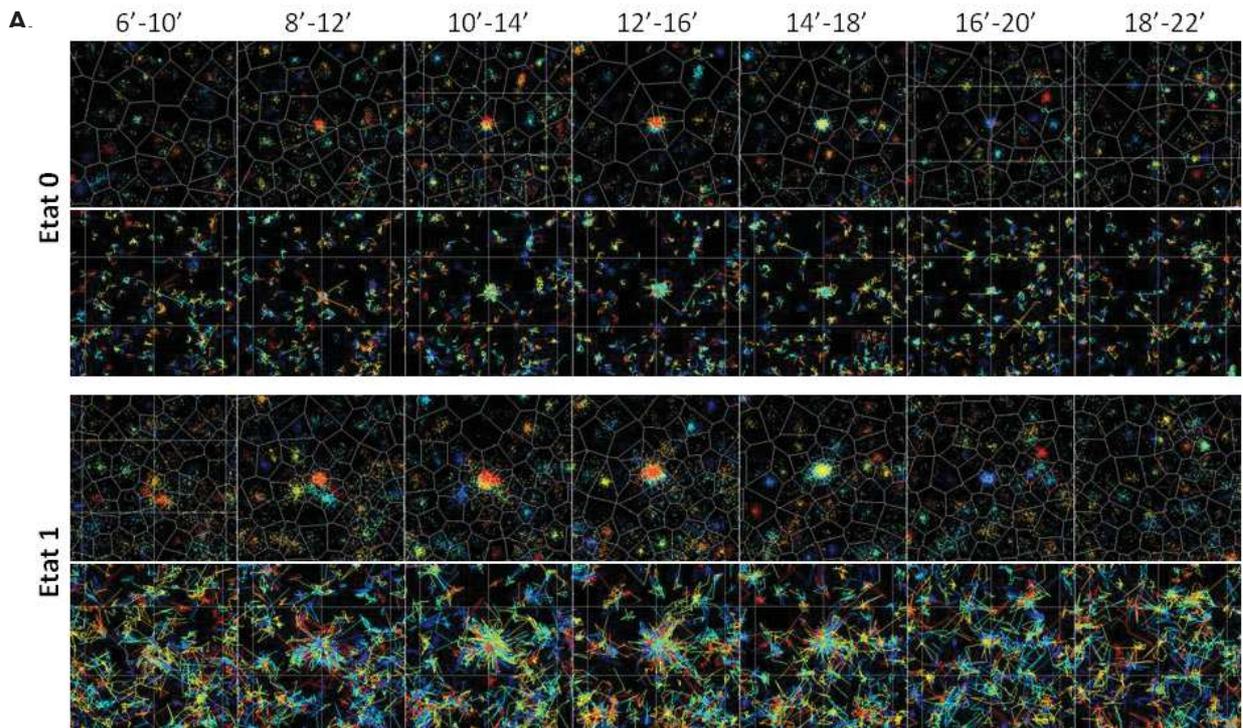


Figure 76: Comparaison des fluctuations d'énergie calculées pour l'état 0 (protéines immobiles) et pour l'état 1 (protéines mobiles). Les trajectoires sont triées pour séparer les trajectoires confinées d'une part et les trajectoires présentant une mobilité d'autre part. Le programme de tri des trajectoires a été créé par le Dr. Mohammed El Beheiry, travaillant dans l'équipe du Dr. Maxime Dahan. Un seuil est imposé pour déterminer si la trajectoire est associée comme étant majoritairement mobile ou majoritairement immobile : on considère donc qu'une trajectoire est immobile si 99% de sa trajectoire est immobile.. **A. Localisations et trajectoires classées dans l'état 0 ou 1.** L'état 0 regroupe les protéines dont 99% de leur trajectoire est immobile et l'état 1 regroupe les trajectoires restantes qui seront étudiées dans l'étude. Le partitionnement spatial est représenté sur l'image des localisations. **B. Fluctuations d'énergie potentielle et du nombre de localisation.** L'axe x représente le temps en minutes, l'axe y représente la distance à partir du centre de la plateforme considérée comme l'origine en μm et l'axe z représente l'énergie potentielle en k_BT . Les fluctuations d'énergie sont représentées selon les axes xy (panel du haut), les axes xz (2^{ème} panel), et les axes yz (3^{ème} panel). La calibration des couleurs est représentée à droite : minimum d'énergie en bleu (-10kT) et maximum en rouge ($+10\text{kT}$).

mutantes quant à la densité de localisations et la durée de persistance de la plateforme d'assemblage suivie dans le temps.

Il est important de noter que les cellules étudiées présentent un nombre important de plateformes déjà formées à t_0 . Comme notre étude s'intéresse aux énergies qui mènent à la formation d'une plateforme ainsi qu'à leurs fluctuations au cours de sa formation, nous avons dû nous affranchir de la contribution des plateformes déjà formées. Pour cela, nous avons utilisé quatre critères pour sélectionner une plateforme d'assemblage à étudier :

1. Le nombre de localisations au centre de la plateforme d'assemblage doit augmenter avec le temps et atteindre un maximum N_{\max} au moins trois fois supérieur au nombre de localisations avant l'apparition de la plateforme
 2. Le coefficient de diffusion de Gag-(i)mEOS2 au centre de la plateforme d'assemblage doit être inférieur au coefficient de diffusion des protéines en périphérie de la plateforme. En effet, nous avons vu dans la partie précédente que les plateformes d'assemblages sont associées à des trajectoires confinées et une diffusion moindre
 3. La taille des plateformes d'assemblage considérées ne doivent pas excéder une taille apparente supérieure à 300nm. Ce critère est spécifique à l'étude des plateformes de Gag-(i)mEOS2 dHBR qui a la particularité de former des vésicules intracellulaires de Gag-(i)mEOS2 qui apparaissent à la membrane (cf figure 62 - page 132)
 4. Les plateformes déjà présentes au temps initial sont exclues.
- Extraction des paramètres d'énergie par Inférence et tri des trajectoires

Une plateforme d'assemblage, telle que nous l'avons définie, est composée d'un nombre important de protéines Gag-(i)mEOS2 dans un petit espace. Il existe donc une forte probabilité pour qu'un signal provienne de cette plateforme de manière continue. Il existe aussi une forte probabilité pour que deux ou plusieurs protéines de Gag-(i)mEOS2 soient activées de façon simultanée. Ceci se traduit par l'existence de trajectoires confinées très longues (pouvant aller jusqu'à l'ordre de la minute). Ces dernières créent un puits de potentiel infini. En effet, les protéines associées à une seule trajectoire sont considérées comme étant immobiles, donc avec un indice de confinement très grand au centre de la plateforme d'assemblage. En parallèle, nous avons observé que les protéines de Gag-(i)mEOS2 situées au bord de la plateforme d'assemblage semblent dirigées vers le centre du puits (figure 74). Leur indice de confinement est donc faible. La différence d'énergie potentielle de ces deux types de trajectoires est très grande, suggérant un piège énergétique dont les forces mises en jeu sont extrêmes. Sauf que l'indice de confinement au centre de la plateforme n'est pas représentatif de l'état réel des protéines de Gag-(i)mEOS2 confinées au sein de la plateforme, mais le reflet des fausses reconnections. Pour pallier cela, les trajectoires sont triées pour séparer les trajectoires confinées d'une part (figure 76.A - panel du haut) et les trajectoires présentant une mobilité d'autre part (figure 76.A - panel du bas). Les trajectoires dont 99% de leur déplacement est

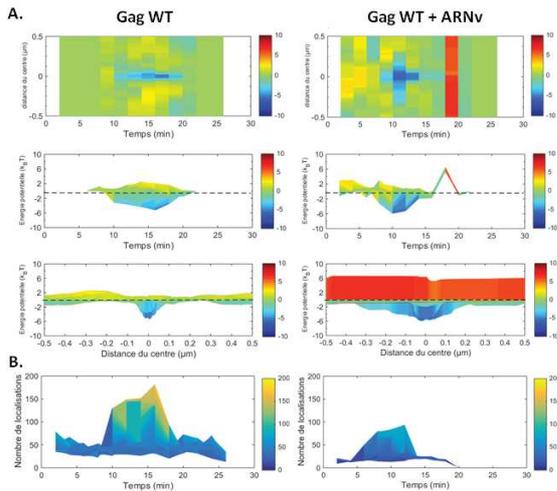


Figure 77 : Fluctuations spatiales et temporelles de l'énergie potentielle de Gag-(i)mEOS2 lors de la formation d'une plateforme d'assemblage. L'évolution la plus caractéristique est représentée. Les trajectoires de l'état 1 sont utilisées. Les coordonnées xy du centre de la plateforme d'assemblage sont utilisées comme origine pour mesurer les fluctuations d'énergies dans un rayon de $1\mu\text{m}$.

A. Fluctuations d'énergie potentielle dans le temps et l'espace des protéines Gag-mEOS2 et de ses dérivés. axe x: temps (minutes), y: distance à partir du centre de la plateforme (μm), z: énergie potentielle. Panel haut : $y(x)$. Panel du milieu : $z(x)$. Panel bas : $z(y)$. La calibration des couleurs est représentée à droite : minimum d'énergie en bleu (-10kT) et maximum en rouge ($+10\text{kT}$). **Figure 33.B. Évolution du nombre de localisation dans le temps.** L'évolution du nombre de localisations des protéines classées dans l'état 1 est représentée. En bleu 0 localisation, en vert 100 localisations et en rouge 200 localisations.

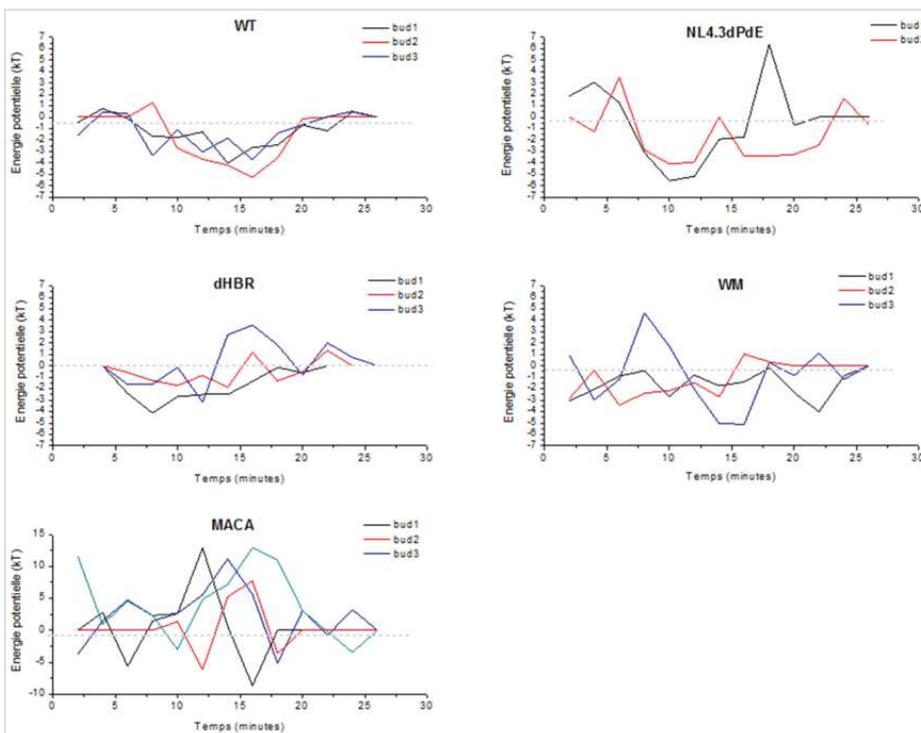
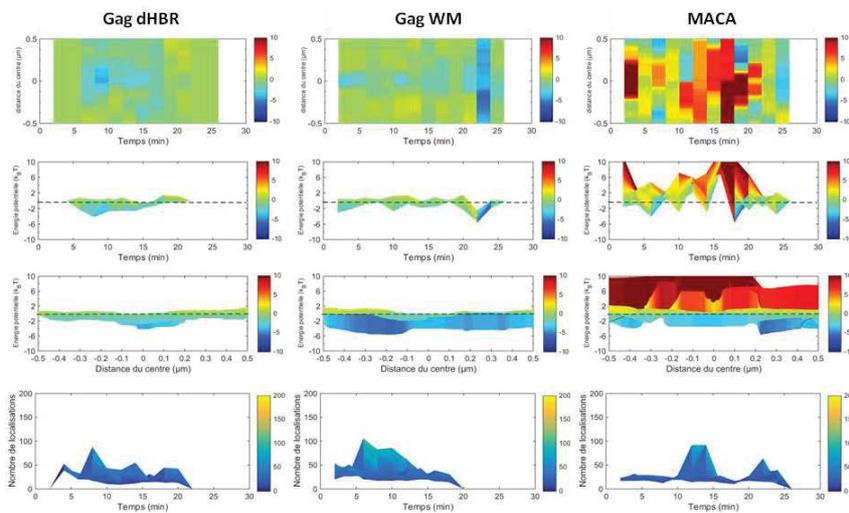


Figure 78: Evolution de l'énergie potentielle dans le temps au centre des plateformes d'assemblage. Les valeurs d'énergie potentielle au centre de la plateforme d'assemblage sont représentées en fonction du temps pour chaque bourgeon viral étudié (= bud).

confiné en un espace restreint proche de la précision de localisation (i.e ~40nm) sont classées dans l'état 0 : les trajectoires issues des fausses reconnections associées à une plateforme d'assemblage sont donc attribuées à l'état 0 tandis que toutes les autres trajectoires sont classées dans l'état 1.

Les fluctuations d'énergie potentielle des protéines de l'état 0 sont très importantes durant les 10 premières minutes : il y a peu de localisations présentes durant ce laps de temps induisant des biais lors du calcul d'inférence (figure 76.B). Au delà, les fluctuations d'énergie sont assez faibles. Cette observation fait sens car toutes les protéines classées dans l'état 0 sont majoritairement confinées, il est donc théoriquement impossible d'observer un champ de force. Les différences d'énergies potentielle des protéines Gag-(i)mEOS2 entre l'extérieur et l'intérieur de la plateforme d'assemblage sont donc faibles. Au niveau de l'état 1, en revanche, l'augmentation du nombre de localisations au centre de la plateforme d'assemblage s'initie en même temps que l'apparition de fluctuations d'énergies qui définissent un puits de potentiel. Sachant que l'on s'est affranchi des trajectoires induites par les fausses reconnections, nous pouvons donc considérer que ces fluctuations sont représentatives de l'état énergétique des protéines Gag-(i)mEOS2.

5.1.2. Etude des fluctuations d'énergie potentielle dans le temps et l'espace

Afin de décrire au mieux l'assemblage viral, nous avons observé les fluctuations de l'énergie d'attraction dans le temps et l'espace (figure 77). La formation d'une plateforme d'assemblage est révélée par l'apparition d'un enrichissement local de protéines Gag-(i)mEOS2. La figure 77.B est un exemple de cet enrichissement obtenu sur une plateforme (le cas de Gag-(i)mEOS2 WT étant le plus représentatif). Une fois identifiée, nous pouvons ainsi nous focaliser sur l'évolution spatio-temporelle de l'énergie potentielle associée à cette formation, en la mesurant autour de la position centrale de la plateforme. La figure 77.A montre ainsi, qu'avant qu'une plateforme d'assemblage n'apparaisse, les protéines Gag-(i)mEOS2 ne présentent pas de variations d'énergie potentielle significatives ($\Delta E \leq 1$). Au cours du temps, on voit apparaître ($t = 8$ min dans le cas de Gag-(i)mEOS2 WT) la formation d'un puits énergétique qui croît jusqu'à atteindre un ΔE maximum ($t = 16$ min) avant de retourner à sa valeur initiale ($t = 22$ min dans le cas de Gag-(i)mEOS2 WT). Les protéines Gag-(i)mEOS2 WT détectées ensuite retrouvent un comportement équivalent à l'état initial, tant au niveau de leur énergie que du nombre de protéines détectées. La durée de ce processus est d'environ 12 à 14 min pour les trois plateformes étudiées (figure 78), avec une différence d'énergie potentielle maximum moyenne $\Delta E_{max}^{WT} = -4.8 \pm 1$ kT (figure 79).

La présence d'ARNv change peu ce profil énergétique temporel : lors de la formation d'une plateforme d'assemblage par les protéines NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2, un puits de potentiel se forme, corrélé avec l'augmentation de localisations de protéines NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 au centre de cette plateforme. L'énergie potentielle décroît jusqu'à une différence

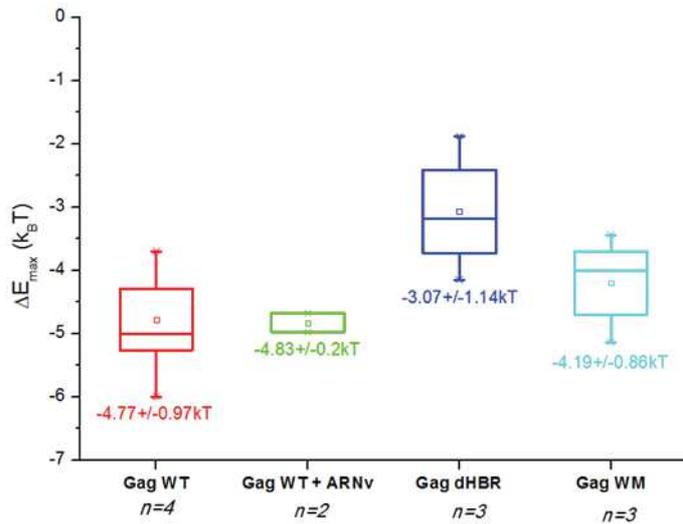


Figure 79 : Différences d'énergie potentielle maximale. La valeur minimale de l'énergie potentielle obtenue dans le temps pour chaque plateforme d'assemblage est utilisée pour obtenir la valeur moyenne des ΔE . WT n=3 ; NL4.3dPdE n= 2 ;Gag dHBR n=3 ; Gag WM n=3, observation sur une seule cellule

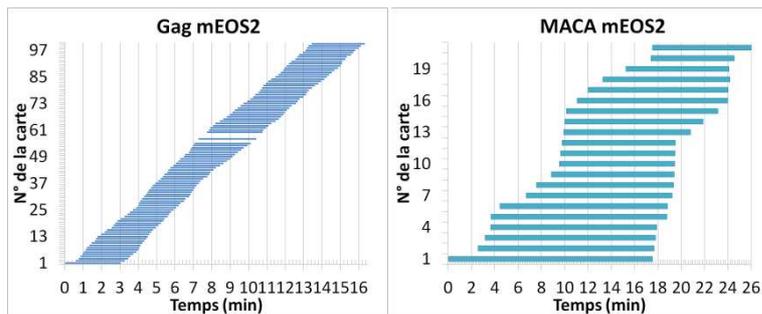


Figure 80: Découpage temporel automatisé des plateformes d'assemblage. La durée de chaque carte est représentée en bleu pour WT et en vert pour MACA.

d'énergie potentielle maximum moyenne $\Delta E_{max}^{NL4.3dPdE} = -4.8 \pm 0.2 \text{ kT}$ (figure 79). La durée de formation des deux bourgeons viraux étudiés ici est de 10 à 20 minutes.

La suppression de la région basique de la matrice (Gag-(i)mEOS2 dHBR), ou l'altération de la dimérisation de la capsid (Gag-(i)mEOS2 WM) perturbe la formation de ce puits de potentiel lors de la formation d'une plateforme d'assemblage. En effet, il n'y a pas d'apparition d'un puits de potentiel défini comme nous avons pu l'observer pour le Gag-(i)mEOS2 WT, bien que des diminutions de l'énergie potentielle de ces protéines apparaissent au cours du processus, pouvant atteindre des ΔE proches de ceux retrouvés pour le Gag-(i)mEOS2 WT : $\Delta E_{max}^{dHBR} = -3 \pm 1.1 \text{ kT}$, et $\Delta E_{max}^{WM} = -4.1 \pm 0.8 \text{ kT}$. Malheureusement, l'étude des fluctuations de la protéine MACA-(i)mEOS2 est compromise par le peu de protéines détectables et triées dans l'état 1, aboutissant à des valeurs d'énergie aberrantes, quel que soit la plateforme étudiée.

L'analyse des trajectoires individuelles d'un grand nombre de protéines Gag-(i)mEOS2 à l'aide d'une approche qui prend en compte à la fois la diffusion et la directionnalité des protéines suggère que la plateforme d'assemblage fonctionne comme un piège énergétique pour les protéines Gag-(i)mEOS2. La formation d'un piège énergétique suggère que, lorsque les protéines Gag-(i)mEOS2 diffusant à la membrane s'approchent d'une plateforme d'assemblage en formation, elles y sont capturées. L'ordre de grandeur des énergies mesurées pour Gag-(i)mEOS2 WT exprimé seul ou avec l'ARNv (NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2) montre qu'à proximité d'une plateforme ($d < 200 \text{ nm}$), une protéine Gag-(i)mEOS2 WT a 120 fois plus de chance de se retrouver à l'intérieur de celle-ci que d'y échapper. Cette probabilité tombe à 60 pour Gag-(i)mEOS2 WM et à 20 pour Gag-(i)mEOS2 dHBR, montrant ainsi que la région basique de la matrice et la dimérisation de la capsid jouent un rôle favorisant dans la régulation de ce processus. L'absence de valeur énergétique mesurable dans le cas de MACA tend à montrer que le recrutement d'ARN semble important pour la réalisation du processus d'assemblage.

5.2. Automatisation de l'inférence Bayésienne : Résultats préliminaires

Au delà du faible nombre de plateformes analysées, plusieurs imperfections apparaissent dans l'approche utilisée jusqu'à présent : la sélection des plateformes est réalisée par l'observation des découpages temporels et la vérification *a posteriori* des critères définis (nombre croissant de localisations, valeur du coefficient de diffusion au centre, taille de l'assemblage...). Le découpage temporel fixé ne s'adapte pas aux cas particuliers : les conditions spécifiques, telles que les lymphocytes exprimant MACA-(i)mEOS2, ne peuvent donc pas être étudiées.

Une méthode d'automatisation a été développée par le Dr. Jean-Baptiste Masson pour permettre l'étude des plateformes d'assemblage avec une sélection des plateformes *a priori*, sur toute la surface de la cellule, et avec un découpage temporel adaptatif.

La méthode de localisation et de reconnexion est différente de celle utilisée jusqu'à présent. La position de chaque molécule fluorescente est associée à une probabilité P_{x_1, y_1}

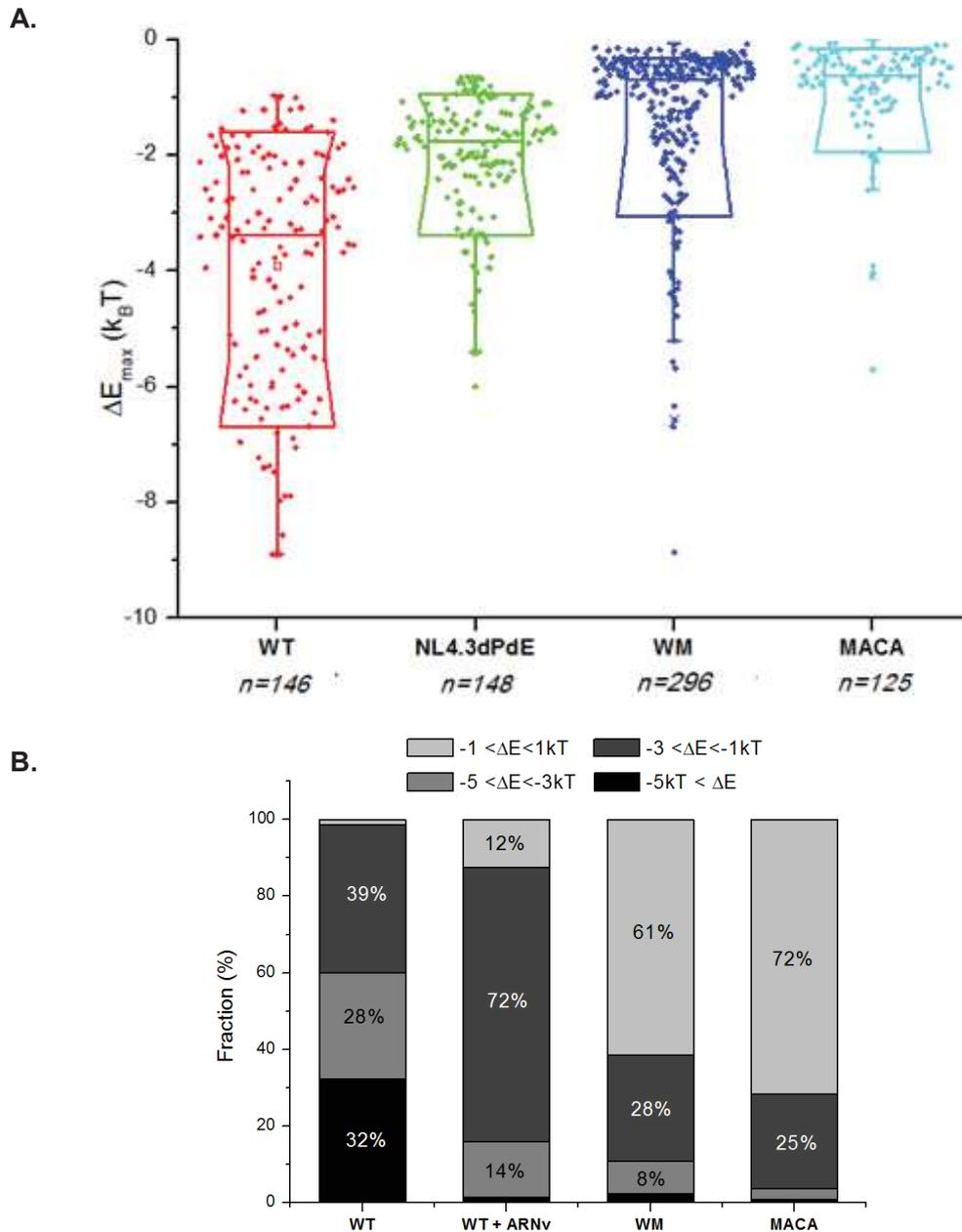


Figure 81 : A. Distribution des maxima de différences d'énergie potentielle. Les fluctuations d'énergie potentielle de chaque plateforme d'assemblage sont suivies dans le temps et la différence d'énergie potentielle maximum est extraite. Chaque valeur est représentée par un cercle plein. Rouge: Gag WT, n=146 plateformes - Vert: NL4.3dPdE (Gag+ARNv), n=148 plateformes - Bleu: Gag WM, n=296 plateformes - Cyan: MACA, n=125 plateformes. **B. Proportions des différentes populations de puits énergétiques,** classées selon la différence d'énergie potentielle maximum: les puits de potentiel inférieurs à -5kT, considérés comme des puits de potentiel à l'indice de confinement très grand ; les puits de potentiel compris entre -3 et -5kT, considérés comme des puits de potentiel forts ; les puits de potentiels compris entre -1 et -3kT, considérés comme étant des puits de potentiel relativement forts au centre duquel les protéines Gag-(i)mEOS2 sont attirées mais dont elles peuvent ressortir ; et les puits de potentiel compris entre 1 et -1kT, qui ne sont pas considérés comme un piège énergétique (pas de confinement).

d'être positionnée aux coordonnées x_1, y_1 au temps t_1 considéré. La reconnexion des trajectoires est également associée à une probabilité conditionnelle de reconnexion Q , prenant en compte la probabilité de localisation P_{x_2, y_2} de la protéine au temps t_2 , sachant la position de la particule P_{x_1, y_1} au temps t_1 . Cette approche déterministe¹ de reconnexion (ou de non-reconnexion, puisqu'en réalité les localisations ne sont pas reconnectées entre elles mais seulement associées à une probabilité Q d'être ou non la même molécule), a été développée spécifiquement pour les systèmes très denses en localisations. Elle permet également de s'affranchir de possibles fausses reconnections entre deux protéines lors de l'établissement de la trajectoire.

La sélection des plateformes d'assemblage est réalisée de manière automatique selon les critères définis plus haut. Une région autour de la plateforme est déterminée et l'inférence est réalisée dès que 800 localisations sont accumulées dans la région d'intérêt sélectionnée (ce qui correspond en moyenne à ~ 16 localisations/zone du maillage Voronoï). Le découpage temporel de chaque carte n'est donc pas fixé mais dépend de la quantité de localisations (Figure 80). Cette méthode permet de s'adapter à la densité de localisations de chaque condition, et d'assurer un calcul d'inférence fiable. Pour la protéine Gag-(i)mEOS2 WT, le découpage temporel est assez homogène tout le long du suivi de la formation de la plateforme d'assemblage considérée. Concernant MACA-(i)mEOS2, le découpage est moins homogène mais permet d'obtenir des informations fiables. Les résultats que je vais donner par la suite sont des résultats préliminaires basés sur l'étude de centaines de plateformes mais obtenues seulement dans une ou deux cellules pour chaque mutant utilisé dans cette étude.

- **Les énergies potentielles impliquées lors de l'assemblage de Gag-(i)mEOS2**

La figure 81 montre que l'on observe la même tendance que précédemment pour Gag-(i)mEOS2-WT. Le puits de potentiel formé a une profondeur moyenne $\Delta E_{\text{moyen}} = -3.9 \pm 2.0$ kT, avec une dispersion marquée (figure 81.A). Ainsi, 32% des puits de potentiels ont une profondeur inférieure à -5 kT, et 28% sont compris entre -3 et -5 kT. Les autres plateformes présentent une différence d'énergie potentielle comprise entre -3 et -1kT. Seuls 1% des plateformes ne présentent aucune fluctuation d'énergie potentielle significative (figure 81.B).

Les protéines NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 induisent également un champ de force attractif mais les fluctuations d'énergie des protéines sont moindres, avec $\Delta E_{\text{moyen}} = -2.0 \pm 1.0$ kT. La distribution des ΔE_{max} est toutefois plus homogène, avec 72% des plateformes qui présentent un puits de potentiel dont la profondeur est comprise entre -3 et -1kT. 12% des plateformes d'assemblage produites ne présentent pas de fluctuations significatives. Bien que surprenante par sa valeur inférieure à celle de Gag-(i)mEOS2 WT, l'homogénéité de la distribution de ces fluctuations d'énergies en présence d'ARNv suggère un rôle régulateur de ce dernier dans le processus d'assemblage. Cependant, cette valeur tend à montrer que les plateformes

¹ l'approche déterministe considère que la probabilité d'occurrence d'un évènement est déterminé par la probabilité d'occurrence des évènements antérieurs

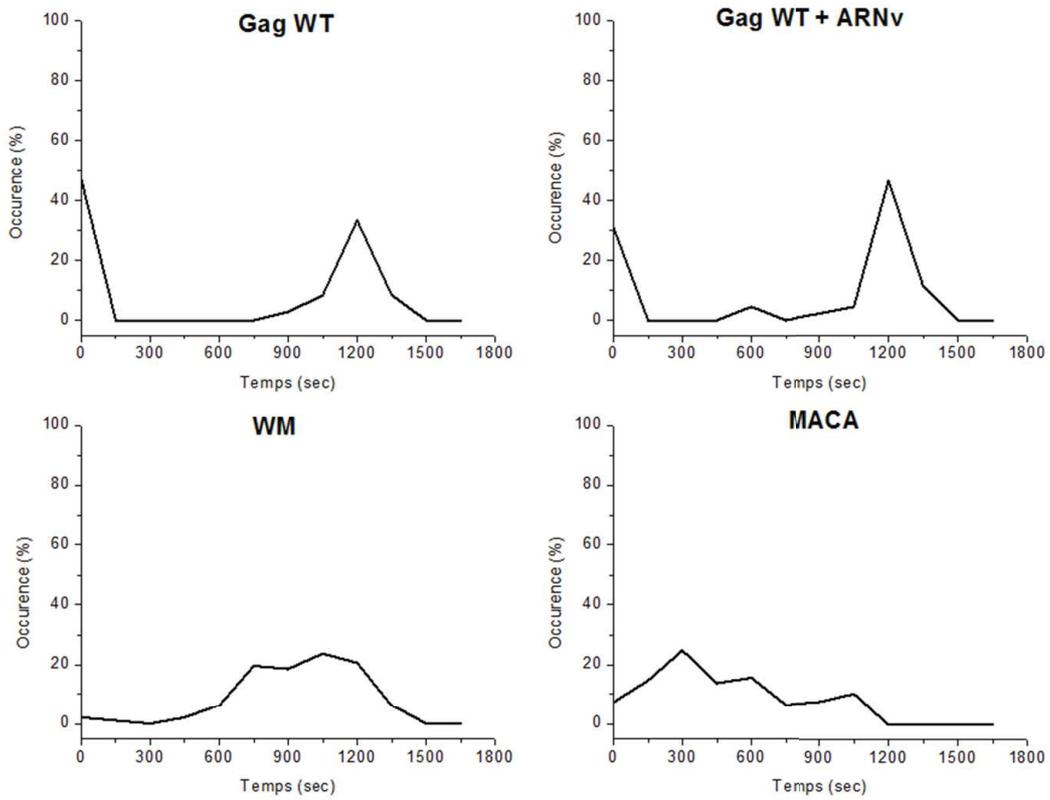


Figure 82 : Durée du processus d'assemblage de Gag(i)mEOS2. Le nombre de plateformes à chaque temps par rapport au nombre total de plateformes étudiées est représenté. La durée de formation d'un bourgeon viral correspond au temps nécessaire pour former le puits de potentiel et revenir à l'état initial.

d'assemblage, en présence d'ARNv, présentent un indice de confinement moins important que les plateformes d'assemblages formées par les protéines Gag-(i)mEOS2 WT.

L'existence d'une mutation dans le motif de dimérisation de la capsidie semble induire de profonds changements sur l'assemblage. En effet 61% des protéines Gag-(i)mEOS2-WM ne subissent pas de fluctuation significative de leur énergie potentielle au centre de la plateforme formée. La profondeur moyenne du puits énergétique est faible, avec $\Delta E_{\text{moyen}} = -1.27 \pm 1.31 \text{ kT}$: l'indice de confinement des protéines Gag-(i)mEOS2 WM au centre de la plateforme d'assemblage est donc faible. La majorité des plateformes d'assemblage formées par ces protéines ne semble donc pas permettre la stabilisation des protéines. Cependant, 39% des plateformes produites par Gag-(i)mEOS2 WM induisent un puits énergétique compris entre -1 et -5 kT, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur de celui observé pour Gag-(i)mEOS2-WT et NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2. Certaines plateformes d'assemblages formées par Gag-(i)mEOS2 WM sont donc en mesure de stabiliser les protéines avec des énergies équivalentes à celles observées chez Gag-(i)mEOS2 WT.

Les domaines matrice et capsidie seuls sont insuffisants pour générer un champ de force attractif. Les différences énergétiques induites par l'assemblage de MACA-(i)mEOS2 sont en moyenne de $\Delta E = -0.85 \pm 0.89 \text{ kT}$: 72% des plateformes ne forment pas de puits énergétique, et seulement 25% permettent la formation d'un puits dont les différences d'énergie sont comprises entre -1 et -3kT. 4% des plateformes étudiées semblent cependant atteindre des valeurs d'énergie inférieures à 3kT. Les protéines MACA-(i)mEOS2 ne sont plus en mesure de recruter d'ARNs au cours de l'assemblage viral. L'observation selon laquelle ces protéines ne semblent plus être en mesure de créer un champs attractif lors de l'assemblage viral tend à appuyer le rôle important de l'ARN dans l'assemblage de Gag-(i)mEOS2.

- **La durée du processus d'assemblage viral des protéines Gag-(i)mEOS2**

Lors du processus d'assemblage de Gag-(i)mEOS2 WT, les minima d'énergie sont mesurés entre 15 et 22.5minutes (53% des plateformes observées), bien que la majorité des bourgeons viraux soit formée en 20 minutes (33%) (figure 82). La présence d'ARNv, représentée par les plateformes formées par NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2, ne change pas cette valeur : 64% des plateformes sont formées entre 15 et 22.5minutes et 46% des plateformes se forment en 20min. Cependant, la présence d'ARNv semble favoriser l'émergence d'une petite population de plateformes qui se forment en 10 minutes (4% des plateformes totales). Ces valeurs correspondent aux durées décrites par Ivanchenko et al en 2009 qui estimait que 90% de l'assemblage d'un virion était achevé en 8 à 9 minutes, bien que la particule virale formée ne semblait être libérée dans le milieu extracellulaire que 25 \pm 11minutes après le début de l'assemblage [Ivanchenko et al., 2009].

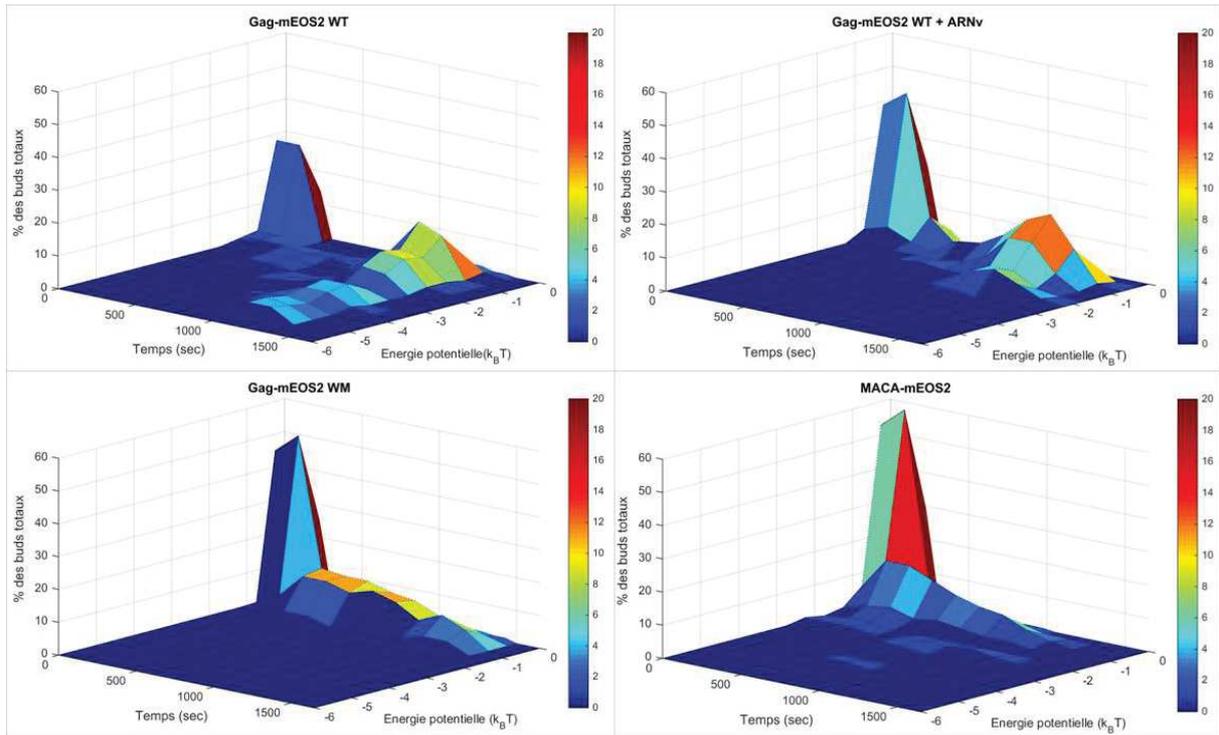


Figure 83 : Représentation des populations de plateformes selon la durée du processus d'assemblage et l'énergie potentielle mise en jeu.

L'altération des interactions CA-CA induit des variations dans le temps d'apparition de ces minima (de 7 à 22 minutes) qui présentent alors une distribution plus hétérogène que celle de Gag-(i)mEOS2 WT. En effet, 28% des plateformes présentent un minimum d'énergie entre 7.5 et 12.5 minutes. Pour comprendre cette signification, nous devrions corrélérer ces temps courts à la densité de protéines observées au sein de la plateforme afin de déterminer si ces plateformes mettent moins de temps à se former ou si elles ne sont que partiellement terminées.

La durée de formation estimée pour les plateformes induites par MACA-(i)mEOS2 est largement altérée : 76% des plateformes étudiées montrent un minimum énergétique en moins de 10 minutes, et seulement 17% des plateformes sont formées entre 15 et 17.5 minutes. Le recrutement d'ARN par le domaine NC semble donc, encore une fois, essentiel à la formation d'un bourgeon viral.

La figure 83 montre la distribution des valeurs de minima d'énergies observées en fonction du temps de bourgeonnement. Elle illustre parfaitement l'homogénéité temporelle et énergétique observée dans le cas de Gag-(i)mEOS2 en présence d'ARNv (NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2) avec l'apparition d'un pic unique centré vers -2 kT et 1200 secondes, là où Gag-(i)mEOS2 WT montre plusieurs pics énergétiques à 1200 secondes. Pour MACA et WM on observe une absence totale de pic à 1200 secondes, mais plutôt un continuum temporel avec de faibles énergies.

Il faut noter que pour chaque conditions, on observe une population de plateformes déjà formées au début d'acquisition, qui ne possèdent pas de fluctuations énergétiques significatives (durée comprise entre 0-300 secondes et $0 < \Delta E < -1 \text{ kT}$). Cette population est plus ou moins importante selon les conditions : faible pour Gag-(i)mEOS2 WT en présence (39%) ou non (27%) d'ARNv, plus élevée pour MACA (50%) ou WM (56%). Cette population peut être interprétée de deux manières : soit ce pic représente des événements déjà présents au début de l'acquisition, qui n'ont pas été filtrées lors de l'automatisation. Nous regardons alors des plateformes d'assemblage déjà formées. Soit cette population représente ce que nous avons appelé des événements d'assemblage abortif : en effet, en suivant l'évolution temporelle des plateformes d'assemblage, nous avons pu remarquer certaines plateformes qui commencent à se former (augmentation de nombre de localisations localement corrélé à la diminution du coefficient de diffusion) mais qui disparaissent ensuite assez rapidement sans jamais atteindre la densité de localisations que nous avons pu observer pour les plateformes d'assemblage étudiées ici. Nous avons supposé que ces événements correspondaient à des processus d'assemblage qui s'initiaient, mais qui se désassemblaient avant d'arriver à la fin du processus d'assemblage.

5.1. Conclusion et discussion

A la membrane, les protéines Gag-(i)mEOS2 créent des plateformes d'assemblage qui semblent agir comme un piège énergétique au centre duquel les protéines sont stabilisées. Le

processus d'assemblage viral serait donc à l'origine d'un champ de forces qui attirerait les protéines Gag-(i)mEOS2 vers le centre de la plateforme en formation afin de recruter Gag-(i)mEOS2.

Les énergies potentielles mises en jeu lors de l'assemblage sont majoritairement de l'ordre de 1 à 3kT, même si certains puits atteignent des profondeurs plus grandes d'~5kT. A titre de comparaison, l'équipe d'A. Triller a utilisé la même méthode d'analyse pour étudier la dynamique d'interaction des récepteurs des neurotransmetteurs de Glycine avec la Gephyryne aux synapses. Ils mettent en évidence que les réseaux de Gephyryne agissent comme des pièges énergétiques d'~3kT pour ces récepteurs, qu'ils estiment comme étant des puits de faible profondeur. Ainsi, selon eux les protéines peuvent s'échapper du piège énergétique créé [Masson et al., 2014 ; Salvatico et al., 2015]. Par analogie, nous pouvons donc considérer que les protéines Gag-(i)mEOS2 sont piégées au niveau de la plateforme d'assemblage mais peuvent également s'en échapper : l'interaction serait donc majoritairement réversible, bien que certaines plateformes semblent présenter des interactions plus fortes.

Il est important de noter que des trajectoires de Gag-(i)mEOS2 sont reconstruites après la disparition de la plateforme d'assemblage à l'endroit où le bourgeon était situé. Cette observation met en évidence soit la libération du bourgeon viral, soit la disparition de la plateforme qui se désassemble.

Le recrutement d'ARN semble important à la réalisation d'un assemblage productif, comme le démontre l'incapacité des protéines MACA-(i)mEOS2 à générer un champ de forces équivalent au Gag-(i)mEOS2 WT lors de l'assemblage viral. Cette observation est en accord avec les travaux mettant en évidence le rôle structural de l'ARN dans l'assemblage viral et la formation des particules virales [Cimarelli et al., 2000 ; Muriaux et al., 2001 ; Faivre-Moskalenko et al., 2014]. L'ARNv semble agir comme un régulateur de l'assemblage viral : les protéines NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2 ont une dynamique plus homogène que lorsque seuls les ARN cellulaires sont recrutés (Gag-(i)mEOS2).

La dimérisation de Gag-(i)mEOS2 via ses domaines CA semble favoriser la stabilisation des protéines Gag-(i)mEOS2 au sein de la plateforme, mais semble surtout agir sur la durée du processus d'assemblage. En effet, l'assemblage d'une plateforme formée de protéines Gag-(i)mEOS2 WT dure en moyenne 20 minutes en Lymphocytes T. L'altération des interactions CA-CA induit une réduction significative de cette durée, avec 50% des plateformes qui finissent le processus d'assemblage en moins de 15 minutes.

La durée du processus d'assemblage que nous observons (~20+/-5min) est proche de ce qu'a montré Ivanchenko et al. en 2009 en cellule HeLa, qui estimaient la durée de formation d'un bourgeon viral, de l'apparition d'un site d'assemblage à la libération de la particule virale à 25 minutes environ [Ivanchenko et al., 2009] et légèrement plus long que ce qu'ont montré Jouvenet et al. en 2008, qui estimaient cette durée à 8.5 minutes en moyenne [Jouvenet et al., 2008].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons décrit la dynamique d'assemblage de la protéine Gag du VIH-1 dans les lymphocytes T par une méthode de microscopie de super-résolution dynamique, le sptPALM. Cette méthode nous permet de mettre en évidence des sites d'assemblage individuels et de suivre l'évolution de leur dynamique avec une résolution temporelle inférieure à la seconde et une résolution spatiale inférieure à la taille d'un virion.

L'assemblage de Gag est réalisé en des domaines définis à la membrane plasmique. La répartition membranaire de ces domaines est uniforme sur toute la surface de la membrane. Environ la moitié des plateformes d'assemblage membranaire que nous avons observé correspondent à des virions déjà formés, dont la taille de 127 ± 9 nm correspond à celle des VLPs purifiées. De nombreuses plateformes de taille inférieure peuvent également être observées, que nous avons associées à des plateformes d'assemblage en cours de formation ou à des événements transitoires d'assemblage. L'ordre de grandeur des tailles que nous observons est identique à celui retrouvé par l'observation des VLPs immatures en microscopie électronique [Briggs et al. 2004 ; Pornillos et al., 2003] ou par l'observation des clusters membranaires de Gag fusionnée à un fluorophore [Malkusch et al., 2013 ; Gunzenhäuser et al., 2012].

La morphologie des plateformes d'assemblage ne semble pas altérée par des défauts de multimérisation, mais la densité de plateformes d'assemblage formées est largement impactée. Le défaut de production virale observé pour ces constructions de Gag serait donc induite par leur incapacité à former des plateformes d'assemblage à la membrane. Ainsi, quand bien même la capacité de Gag à former une plateforme d'assemblage peut être réduite, induisant une baisse de production virale, si l'assemblage viral arrive à se réaliser jusqu'au terme du processus, la morphologie de la plateforme resterait inchangée. Cette observation suggère l'implication de facteurs cellulaires qui viennent réguler le processus d'assemblage, qui joueraient un rôle de régulateur lors de la formation d'une plateforme d'assemblage.

La protéine Gag diffuse à la membrane principalement sous forme de multimères, avec un coefficient de diffusion estimé à $0.1-0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Cependant, en présence d'ARNv, la fraction monomérique de Gag membranaire semble être légèrement augmentée. L'hypothèse pour expliquer ceci est que l'ARNv catalyse la nucléation de Gag de manière plus efficace que les ARN cellulaires recrutés par Gag seule. Ainsi, il y aurait moins d'intermédiaires de multimérisation à la membrane. En absence d'ARN viral, Gag diffuserait sous forme de monomère ou dimère dans le cytosol [Ivanchenko et al., 2009 ; Sebla et al., 2010 ; Hendrix et al., 2015] jusqu'à la membrane où il forme rapidement des multimères intermédiaires. Ces multimères diffusent alors latéralement à la membrane jusqu'à ce qu'un processus d'assemblage s'initie pour former une nouvelle particule virale.

En présence d'ARN viral, une petite population de petits clusters de Gag complexés à l'ARNv apparaissent dans le cytosol [Sebla et al., 2010 ; Hendrix et al., 2015 ; El Meshri et al., 2015]. L'ancrage membranaire de ce complexe Gag/ARNv définirait le site d'assemblage, où des

monomères de Gag diffusant à la membrane et dans le cytosol viendraient s'assembler directement.

La dimérisation de la capsidie semble favoriser la stabilité d'interaction de Gag avec la membrane : en effet, la mutation 184-WM/AA-185 au sein de la capsidie semble former moins de multimères membranaires, augmentant ainsi la fraction monomérique des protéines Gag mutées à la membrane plasmique de Lymphocytes T.

Si la dimérisation de la capsidie semble être un facteur favorisant l'assemblage viral, le recrutement d'ARN semble être un facteur majeur dans la réalisation de ce processus. En effet, la dynamique membranaire de la protéine MACA-(i)mEOS2 est très différente du Gag sauvage, et la dynamique de ces protéines au sein des plateformes d'assemblage formées est largement altérée. L'ARN semble également jouer un rôle majeur dans la stabilité d'interaction Gag/membrane. En effet, les domaines matrice et capsidie seuls, qui ne peuvent plus recruter d'ARN, ne semblent pas stabilisés à la membrane plasmique. Cette constatation est révélée par le peu de localisations qu'il est possible de reconstruire en illumination TIRF, et les altérations importantes de la dynamique de ces protéines MACA comparée aux protéines sauvages.

Afin de comprendre les interactions moléculaires mises en jeu au cours de l'assemblage de Gag, nous avons étudié les fluctuations des énergies potentielles associées à la formation d'une plateforme d'assemblage virale. L'assemblage de Gag induit la formation d'un champ de forces attractives autour de la plateforme d'assemblage, avec une différence d'énergie potentielle estimée à 3.89kT. Cette énergie tend à montrer que l'assemblage viral est un processus irréversible. Cependant les énergies impliquées sont très variables d'une plateforme d'assemblage à une autre en absence d'ARNv.

La présence d'ARNv (NL4.3dPdE-Gag-(i)mEOS2) induit une diminution du gradient d'énergie potentielle observé, avec un puits de potentiel d'une profondeur maximale moyenne de 2kT, mais une plus grande homogénéité des énergies observées. Cette diminution peut être expliquée par les hypothèses de Jouvenet et al. ainsi que de Hendrix et al. : ils suggèrent que des protéines Gag cytosoliques viennent multimériser à la membrane directement au niveau du site d'assemblage qui est initié par l'ancrage d'un complexe Gag/ARN [Jouvenet et al., 2011 ; Hendrix et al., 2015]. Ainsi, une partie des protéines Gag attirées au niveau de la plateforme d'assemblage ne passeraient pas par une diffusion membranaire latérale. Elles sont donc indétectables par notre système de mesure. Cette hypothèse pourrait également apporter une explication à l'hétérogénéité des gradients d'énergie observés lors de l'expression de Gag seule : même si la diffusion membranaire de Gag sous forme de multimères est augmentée, et nous permet ainsi de mieux observer les fluctuations d'énergie membranaire, une population cytosolique de Gag, en quantité aléatoire, peut venir interagir directement avec la plateforme d'assemblage.

Parmi les plateformes d'assemblage étudiées, on observe une population non négligeable de plateformes dont la formation requiert peu d'énergie ($\Delta E < 1kT$) et dont les temps de formation sont compris entre 0 et 6 minutes. Pourtant, le nombre de protéines Gag augmente localement avant de disparaître. Nous associons ces plateformes à des événements d'assemblage abortifs, c'est-à-dire un processus d'assemblage qui commence à s'initier mais se désassemble avant la fin du processus. Cette observation renforce l'hypothèse de l'implication de facteurs cellulaires au cours de l'assemblage, ou du moins de facteurs extérieurs à Gag qui agissent comme catalyseur de l'assemblage viral.

Une partie de l'assemblage de Gag reste en suspend dans notre étude: nous ne sommes pas en mesure de connaître les événements précoces qui initient la formation d'une plateforme d'assemblage. Quels sont les événements qui permettent de passer de la diffusion membranaire des protéines Gag monomériques ou multimériques au début du processus d'assemblage viral? Quels sont les acteurs et la dynamique de ces événements précoces? De même, nous ne sommes pas en mesure de comprendre ce qui régule la fin du processus d'assemblage : quels sont les déterminants qui permettent de mettre fin au processus d'assemblage?

La durée du processus d'assemblage est très stable, quelque soit la plateforme d'assemblage observée et quelque soit l'énergie impliquée : on estime ainsi qu'un processus d'assemblage dure en moyenne 20 ± 5 minutes en Lymphocytes T. La présence ou l'absence d'ARNv ne change pas la durée de formation d'une plateforme d'assemblage.

La dimérisation de la capsidie semble être un facteur qui favorise la formation des plateformes d'assemblage, son altération diminuant la proportion de plateformes d'assemblage dont les fluctuations d'énergie sont proches du Gag sauvage. Cependant, la dimérisation de la capsidie semble jouer un rôle quant à la durée du processus d'assemblage. En effet, les événements observés durent en moyenne moins longtemps qu'un assemblage réalisé par un Gag sauvage. Ces observations font penser aux travaux de Datta et al., qui avaient montré que la morphologie des VLPs produites par Gag-WM était hétérogène contrairement aux VLPs produites par le Gag sauvage [Datta et al., 2007]. Il est possible que l'altération des interactions Gag-Gag médiées par la dimérisation de la capsidie forme des bourgeons viraux dont la stœchiométrie de Gag est différente du Gag sauvage. Il serait intéressant à l'avenir d'essayer de coupler les méthodes mathématiques disponibles aujourd'hui pour connaître une estimation du nombre de molécules de Gag par plateforme d'assemblage formée, et corrélérer ces résultats aux fluctuations d'énergies potentielles : est-ce que les plateformes d'assemblage impliquant moins d'énergie accumulent moins de protéines Gag dans ses VLPs?

Par ailleurs, il serait également intéressant de connaître l'effet de la compaction de Gag sur le processus d'assemblage grâce à un mutant de la région sp1 de Gag. En effet, Guo et al. ainsi que Datta et al., ont montré que les dix premiers acides aminés de la région sp1 de Gag se repliaient en hélice via la multimérisation de Gag. Ce repliement induirait une compaction de Gag

plus importante, et augmenterait ainsi l'ordre moléculaire des protéines Gag [Guo et al., 2005; Datta et., 2015]. Une mutation du domaine sp1 induisant un défaut de compaction des protéines Gag, à partir d'un certain seuil de multimérisation de la protéine, nous permettrait de connaître l'impact de l'ordre moléculaire lors de la fin de l'assemblage viral.

Les temps de formation observés correspondent à ce qu'avait déterminé Ivanchenko [Ivanchenko et al., 2009]. Cependant, ils avaient estimé que la nucléation durait 8 à 9 minutes, bien qu'ils observaient un retard dans la libération de la plateforme d'assemblage aboutissant à un processus total d'une durée de 25 minutes. Nos observations sont légèrement différentes, car les fluctuations d'énergie évoluent durant toute la durée de présence de la plateforme d'assemblage. Cependant, nous associons l'énergie potentielle que nous observons à l'auto-assemblage de Gag à membrane. Mais il est possible qu'une partie de l'énergie mesurée soit due à la dynamique de la membrane : la formation d'un bourgeon viral induit une courbure membranaire. Puisque nous observons une projection en deux dimensions des trajectoires de Gag, cette déformation de la membrane pourrait induire une directivité apparente, et une certaine fluctuation énergétique des protéines Gag vers le centre de la plateforme. En effet, l'étude des fluctuations d'énergie potentielle permet d'avoir une estimation de l'indice de confinement des protéines engagées dans le piège énergétique. Le fait que nous observons un puits de potentiel tout au long de la présence de la plateforme d'assemblage à la membrane pourrait également indiquer que les protéines Gag sont stabilisées au niveau du bourgeon viral en formation tout au long du processus d'assemblage, même si la nucléation de Gag est terminée. Cette suggestion renforce l'importance d'avoir une estimation du nombre de molécules de Gag au sein des plateformes d'assemblage. En effet, nous pourrions répondre partiellement à cette interrogation grâce à l'évolution du nombre de molécules par clusters.

La méthode d'analyse développée par Dr. Jean-Baptiste Masson permet d'estimer l'entropie locale des protéines Gag pour chaque zone du maillage réalisé. Ce paramètre apporte des informations quant à l'organisation moléculaire des protéines localement. Il serait intéressant de connaître dans quelle mesure l'«ordre moléculaire» des protéines Gag est impacté au cours de l'assemblage, et notamment déterminer l'impact de la dimérisation de la CA sur cet organisation moléculaire. Cette approche permettrait de comprendre dans quel mesure l'organisation spatiale des protéines Gag influe sur le processus de nucléation et la formation d'un bourgeon viral.

Tous nos résultats tendent à mettre en évidence le rôle crucial du recrutement d'ARN au cours de l'assemblage viral, qu'il soit cellulaire ou viral. En effet, l'absence de recrutement d'ARN annihile la capacité de Gag à former une plateforme d'assemblage. L'ARNv semble seulement stabiliser le processus d'assemblage en le rendant plus homogène. Il serait intéressant de confirmer cela en étudiant la dynamique de Gag seul avec l'expression conjuguée d'ARNv contenant la séquence d'encapsidation Ψ .

Ces résultats, ainsi que les travaux précédemment cités permettent de proposer un modèle de la dynamique d'assemblage : La protéine Gag diffuse dans le cytosol principalement de manière monomérique. Certaines protéines cependant recrutent l'ARNv auquel elles s'associent sous forme de dimères ou de petits oligomères. Gag s'accumule à la membrane au fur et à mesure que son expression augmente, où il diffuse latéralement sous forme de monomères ou multimères. Les complexes Gag/ARNv s'ancrent dans la membrane et sont utilisés comme site d'initiation de la nucléation de Gag. Le recrutement de protéines cellulaires ou virales, grâce à un mécanisme encore inconnu à ce jour, permet l'initiation de la multimérisation de Gag au niveau de ces complexes. Ce processus induit alors un champ attractif qui attire les protéines Gag aux alentours au centre de la plateforme d'assemblage en formation. Les protéines sont ainsi stabilisées au centre de la plateformes, où elles ne diffusent plus jusqu'à la formation d'un bourgeon viral. En fin de formation, les complexes ESCRT sont recrutés au niveau du site d'assemblage afin de libérer la particule virale néoformée dans le milieu extracellulaire. Un schéma bilan est proposé à la fin de cette partie (figure 84).

L'utilisation du PALM/TIRF et spt-PALM/TIRF, ainsi que les différentes méthodes d'analyse utilisées, nous ont permis de mieux comprendre le processus d'assemblage viral à la membrane des Lymphocytes T. Il est alors possible d'utiliser la même méthode pour aller plus loin dans la compréhension de l'assemblage. Notamment, il serait intéressant d'étudier l'impact du recrutement des protéines d'enveloppes au niveau des sites d'assemblage. Plus largement, il serait intéressant de comparer nos résultats à la dynamique de Gag exprimée à partir du génome viral entier, donc en système infectieux, en Lymphocytes primaires.

Grâce à l'utilisation de drogues, il serait également possible d'étudier l'impact de composés cellulaires sur cet assemblage. Notamment, les travaux de Thomas et al. réalisés dans l'équipe du Dr. Muriaux, et auxquels j'ai participé, ont montré que les protéines IRSp53 et Wave2 jouaient un rôle dans la production virale du VIH-1 [Thomas et al., 2015]. Ces protéines sont des RhoGTPase agissant sur la dynamique de la F-actine corticale dans les cellules. Il serait alors intéressant de mesurer l'impact de la perturbation de la F-actine sur la dynamique d'assemblage viral.

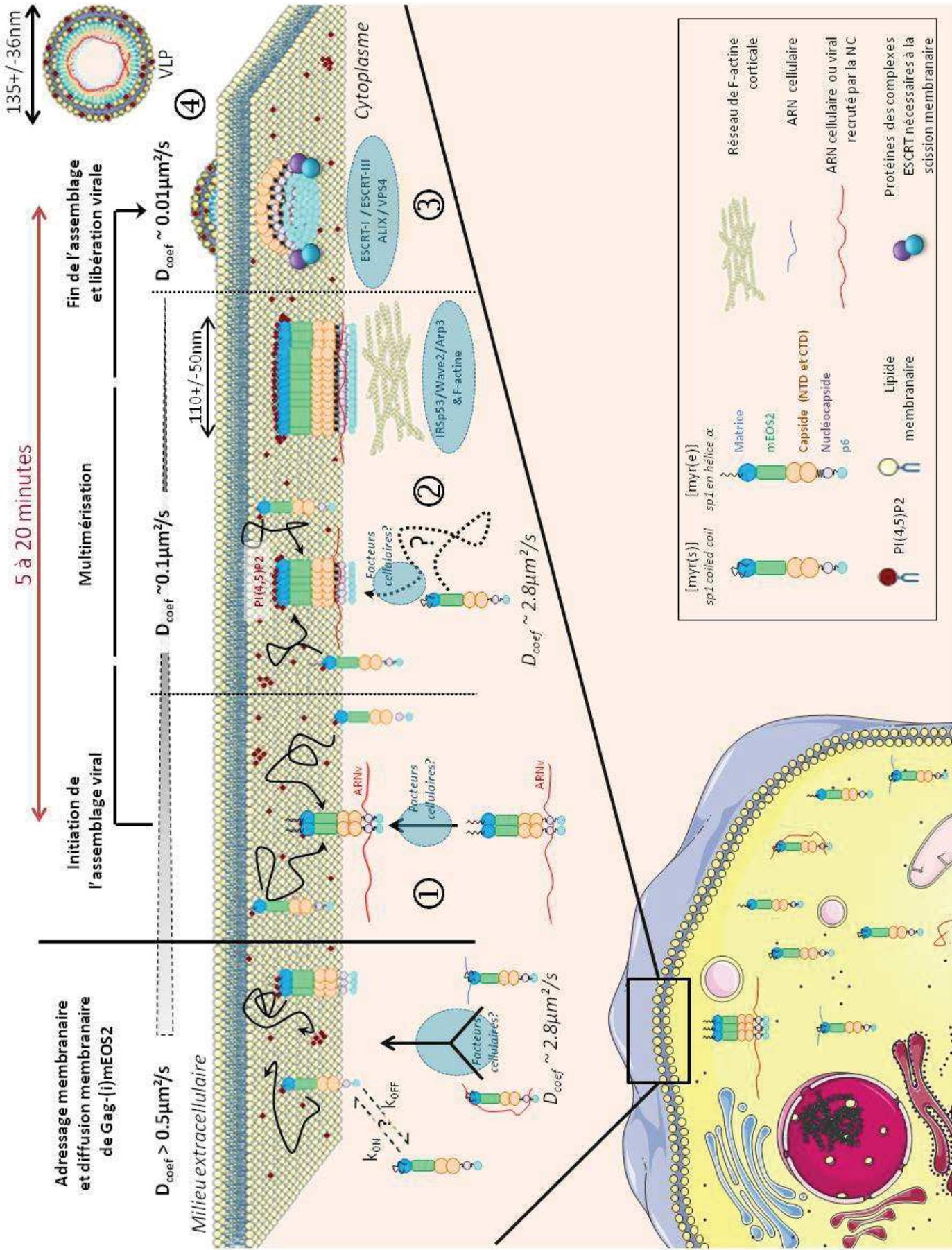


Figure 84 : Dynamique de la protéine Gag-(i)mEOS2 à la membrane plasmique des cellules T et formation d'une particule virale.

Populations cytosoliques de Gag-(i)mEOS2. Une cellule de mammifère est représentée en bas à gauche (membrane en bleu ; cytosol en jaune ; noyau en rose contenant l'ADN en marron ; réticulum endoplasmique rugueux (RER) et lisse (REL) en rouge, les points noirs sur le RER correspondent aux ribosomes; l'appareil de Golgi en bleu ; les vésicules intracellulaires sont représentées par des cercles en rose ; les mitochondries sont représentées par des ovales roses avec les invaginations membranaires). Dans le cytosol, les protéines Gag-(i)mEOS2 diffusent principalement sous forme de monomères ou de dimères, bien qu'une petite population de Gag-(i)mEOS2 semble s'oligomériser dans le cytosol le long de l'ARN viral. Ces protéines recrutent des ARNs cellulaires via leur domaine matrice (MA) (l'ARN recruté par la MA est représenté en bleu) afin de permettre la spécificité d'interaction entre Gag et la membrane plasmique. Le domaine nucléocapside (NC) de Gag-(i)mEOS2 recrute l'ARN viral. Lorsque Gag-(i)mEOS2 est exprimée seule en absence d'ARN viral, la protéine peut recruter des ARN cellulaires [Muriaux et al., 2001 ; Rulli et al., 2007] pour favoriser sa multimérisation (l'ARN recruté par le domaine NC est représenté en rouge). Une portion de la membrane plasmique est agrandie en haut du schéma (rectangle noir sur la membrane de la cellule). La membrane est composée de lipides dont la tête polaire est représentée en jaune et les chaînes acyls en bleu. Pour simplifier le schéma, seuls les PI(4,5)P2 sont représentés différemment des autres lipides avec la tête polaire en rouge foncé. Le milieu intracellulaire est en rose clair et le milieu extracellulaire en blanc. Le schéma se lit de gauche à droite.

Adressage membranaire et diffusion membranaire de Gag-(i)mEOS2. Les protéines Gag-(i)mEOS2 sont représentées avec ses différents domaines, et leurs mouvements sont schématisés par des flèches noires. Les protéines contenues dans le cytosol diffusent avec un coefficient estimé à $2.8\mu\text{m}^2/\text{s}$ par RICS [Hendrix et al., 2015]. Ces protéines sont adressées au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique : des facteurs cellulaires (représentés par un cercle bleu ciel) aident peut être à un adressage efficace. Les interactions avec la membrane sont favorisées par les interactions spécifiques de la région hautement basique HBR de la MA de Gag-(i)mEOS2 avec les PI(4,5)P2 [Ono et al., 2004]. Les protéines Gag-(i)mEOS2 présentent des constantes d'association et de dissociation $K_{\text{ON}}/K_{\text{OFF}}$ avec la membrane inconnues. Selon les estimations que nous avons réalisées par sptPALM, les protéines Gag-(i)mEOS2 ancrées dans la membrane diffusent avec un coefficient de diffusion supérieur à $0.5\mu\text{m}^2/\text{s}$.

L'assemblage viral de Gag-(i)mEOS2 à l'échelle de la protéine unique. L'assemblage viral est divisé en quatre étapes majeures numérotées de ① à ④. Les coefficients de diffusion des protéines Gag-(i)mEOS2 que nous avons associés aux différents événements de l'assemblage viral sont représentés au dessus de la membrane. La mobilité des protéines Gag-(i)mEOS2 semble diminuer au fur et à mesure de l'avancement de l'assemblage viral (représenté par une tête de flèche de la plus grande mobilité vers la plus faible). Cette représentation ne présuppose pas une décroissance linéaire de la mobilité des protéines de Gag-(i)mEOS2. ① **Initiation de l'assemblage viral.** Une protéine (ou un petit oligomère) de Gag-(i)mEOS2 ayant recruté l'ARN viral vient s'ancrer dans la membrane plasmique : ce complexe nucléoprotéique semble être l'initiateur de l'assemblage viral. Les protéines Gag-(i)mEOS2 qui diffusent à la membrane plasmique vont alors s'oligomériser le long de l'ARN. ② **Multimérisation de Gag-(i)mEOS2 au site d'assemblage viral.** Selon les travaux réalisés ici, il semblerait que les protéines Gag-(i)mEOS2 situées à proximité du site d'assemblage soient attirées vers le centre de la plateforme d'assemblage en formation afin d'augmenter la densité locale de protéines. Les protéines diffusant en deux dimensions au sein de la membrane plasmique semblent donc être recrutées, mais il est possible que des protéines issues du cytosol soient également recrutées au niveau de la plateforme d'assemblage bien que ceci n'ait pas été prouvé directement. Les travaux de Charlier et al. en 2014 et de Yandrapalli et al., en 2016 tendent à montrer que les PI(4,5)P2 du feuillet interne de la membrane plasmique sont recrutés par les protéines Gag au site d'assemblage. Ces plateformes en formation, composées de multimères de Gag-(i)mEOS2, sont associées dans notre étude à des événements de mobilité restreinte, avec un coefficient de diffusion estimé à $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$. Les filaments d'actine corticale pourraient jouer un rôle dans la stabilisation de la plateforme d'assemblage au cours de l'assemblage [Thomas et al., 2015]. Les plateformes d'assemblage membranaires à haut degré de multimérisation ont une taille que nous avons estimée à $110\pm 50\text{nm}$ par PALM. ③ **Fin de l'assemblage viral.** 5 à 20 minutes après le début de la multimérisation de Gag-(i)mEOS2 au site d'assemblage, la particule virale semble être formée et les complexes ESCRT (représentés par des bulles bleues et violettes) sont recrutés afin de catalyser la scission membranaire [Von Schwelder et al., 2003] et la libération de la particule virale. Grâce au sptPALM, nous avons estimé que les protéines Gag-(i)mEOS2 dont l'assemblage est terminé diffusent avec un coefficient de $\sim 0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$. ④ **Libération de la particule virale.** Après scission membranaire, la pseudo-particule virale immature est libérée dans le milieu extracellulaire. La membrane virale est enrichie en PI(4,5)P2 [Chan et al., 2008]. Nous avons estimé la taille de ces VLP par PALM à $135\pm 35\text{nm}$.

La cellule ainsi que certains éléments graphiques de la membrane ont été réalisés grâce aux outils mis à disposition par Servier Medical Art.

MATERIEL ET METHODES

1. Culture de cellules

- **Lignée lymphocytaire humaine : Jurkat**

Les cellules T Jurkat (lignée cellulaire de lymphocytes T leucémiques Humain) sont cultivés dans du RPMI-1640 + Glutamax (GIBCO) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF), 1% sodium pyruvate, 0.5% HEPES et 1% antibiotiques (Penicilline/streptavidine) dans une étuve 37°C, 5% CO₂. Les cellules Jurkat sont maintenues en culture à une concentration de 50 000 cellules/mL.

- **Lignée de cellules épithéliale rénales humaines : 293T**

Les cellules humaine HEK 293T sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's medium) supplémenté par 10% de SVF, 1% Sodium pyruvate, 0.5% HEPES et 1% antibiotiques (penicilline/streptavidine) dans une étuve à 37°C avec 5% CO₂.

2. Les plasmides

- **Les plasmides**

Le vecteur lentiviral exprimant Gag, GagPol, Tat, Rev, Nef, Vif et Vpr (p8.2) est décrit dans l'article [Zufferey *et al.*, 1997]. Le plasmide exprimant Gag-(i)mEOS2 et les protéines accessoires et régulatrice hormis Pol et Env (pNL4.3dPdE) est décrit dans l'article [Chen *et al.*, 2014], et provient du laboratoire du Dr Eric Freed (NIH, Frederick, MD, USA). Le plasmique Gag-(i)mEOS2 a été donné à l'équipe par le Dr Hugues de Rocquigny (Strasbourg, France)

- **Mutagénèse dirigée**

La mutagénèse dirigée a été réalisée selon le protocole du kit QuickChange (Agilent). Les plasmides sont ensuite amplifiés en *E. Coli*. Les mutations sont vérifiées 2 fois par séquençage (MWG Eurofins): après l'amplification du produit PCR, et après l'amplification du clone sélectionné. Les primers utilisés pour la mutagénèse sont présentés tableau 1 des résultats.

L'amplification du produit PCR est réalisée selon le protocole du kit QuickChange (Agilent). L'amplification du clone sélectionné après séquençage est réalisée selon le protocole du kit Nucleic Bond Xtra Maxi (Machery-Nagel).

3. Transfection

- **Transfection des cellules 293T**

Les cellules 293T sont transfectées au phosphate de calcium selon les travaux de [Hamard-Perron *et al.*, 2010]. La quantité d'ADN transfectée est de 2µg pour 400 000 cellules 293T (par

puits en plaques 6 puits) ou de 8µg d'ADN pour 2'000'000 de cellules en boîte de 10cm². Le milieu de culture des cellules est changé 7-8h après mise en présence des agents transfectant.

- **Electroporation des Jurkats**

Les cellules Jurkat sont électroporées selon le protocole du kit Amaxa Cell line Nucleofactor Kit V (Lonza) à hauteur de 4µg d'ADN pour 2'000'000 de cellules/cuve. Les cellules sont mises en culture dans du RPMI complet pendant 24h après transfection à l'étude 37°C, 5% CO₂.

Dans le cas de l'étude du rôle des RhoGTPases sur la production virale, les siRNA dirigés contre Wave2 et Dia1 [Invitrogen] sont ajoutés à l'ADN à hauteur de 360pmol de steal RNAi, les siRNA dirigés contre IRSp53 et Arp3 [Santa Cruz] sont ajoutés à l'ADN à hauteur de 250pmol de steal RNAi. Après électroporation les cellules sont cultivées en étude 37°C, 5% CO₂ dans du RPMI sans antibiotiques.

4. La flottaison de membranes

- **Sur 293T**

Pour chaque condition, 6'000'000 de cellules HEK 293T sont transfectées comme décrit plus haut. 24h post-transfection, le surnageant viral est prélevé pour une analyse de la production virale. Les cellules sont lavées dans du tampon froid PBS 1X, centrifugées et resuspendues dans un tampon Tris-HCl 10mM pH7.4 contenant 4mM EDTA et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont lysées par homogénéisation au *dounce*, puis centrifugées à 370g pendant 3min pour éliminer les noyaux et obtenir le PNS (*post-nuclear supernatant*). Un gradient de sucrose est réalisé à partir de solutions de 75%, 50% et 10% de sucrose (wt/vol) dans du TNE (25mM Tris-HCl, 4mM EDTA, 150mM NaCl). Le PNS préalablement ajusté à 150mM NaCl est homogénéisé avec le sucrose 75%. Le gradient est ultracentrifugé toute la nuit à 4°C à 35'000rpm dans un rotor Beckman SW60Ti. Huit fractions de 500µL chacune sont collectées de haut en bas du gradient et analysées par western blot.

- **Sur Jurkat**

Pour chaque conditions, 6'000'000 de cellules sont transfectées (x3 cuves d'électroporation/condition) avec le kit V Lonza nucleofactor avec pGag ou p8.2 avec les siRNA selon le protocole décrit plus haut. Après 24h, les cellules sont rincées dans du PBS et remis en culture avec du RPMI neuf. 48h post-transfection, les cellules sont collectées et rincées au PBS 1X et resuspendues dans du tampon TE1X (Tris-HCl 10mM pH7.4 contenant 4mM EDTA) et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont soniquées par 2 pulses de 25 secondes avec un Bioruptor puis centrifugées à 370g pendant 3min pour éliminer les noyaux et obtenir le PNS (*post-nuclear supernatant*). Un gradient

de sucrose est réalisé à partir de solutions de 75%, 50% et 10% de sucrose (wt/vol) dans du TNE (25mM Tris-HCl, 4mM EDTA, 150mM NaCl). Le PNS préalablement ajusté à 150mM NaCl est homogénéisé avec le sucrose 75%. Le gradient est ultracentrifugé toute la nuit à 4°C à 35'000rpm dans un rotor Beckman SW60Ti. Huit fractions de 500µL chacune sont collectées de haut en bas du gradient et analysées par wester blot.

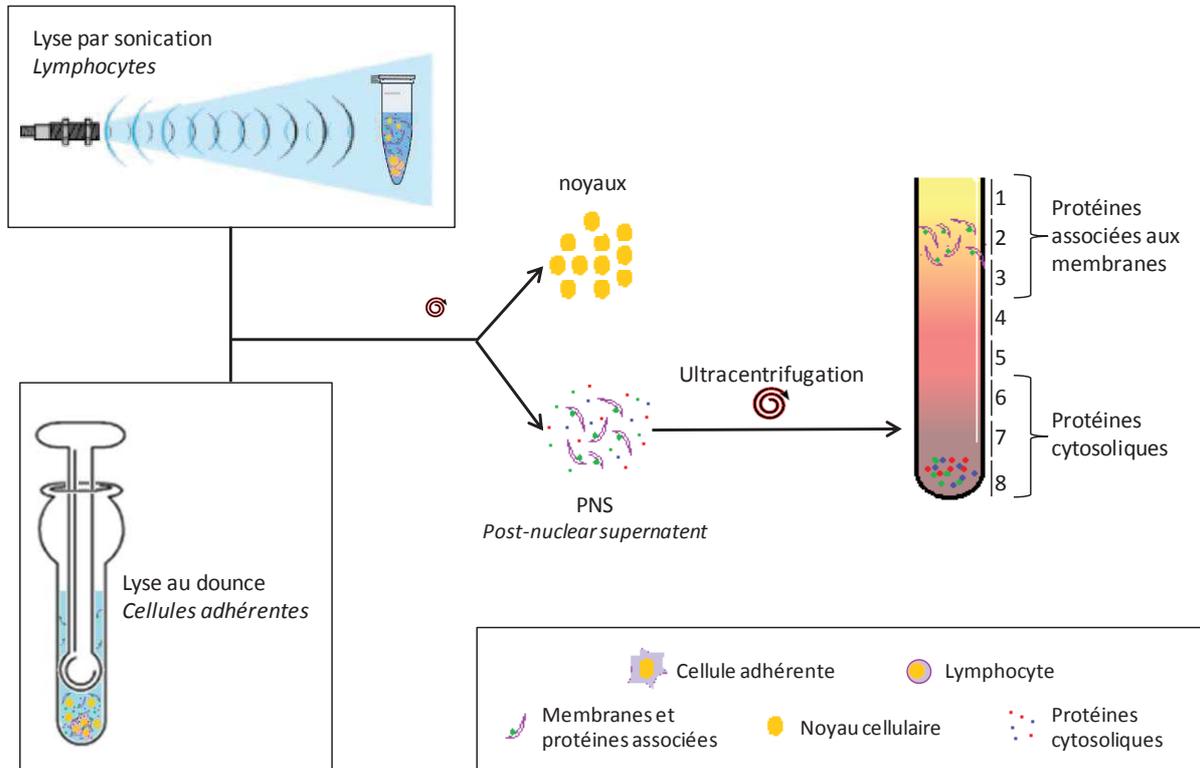


Figure 1 : Schéma des étapes de flottaison de membrane pour les lymphocytes Jurkat et les 293T.

5. FACS

Les cellules Jurkat sont récoltées 24h post-transfection : 100'000 cellules sont prélevées directement à partir des cellules transfectées et analysées par FACS. Le FACS utilisé est un FACScalibur à 1 laser.

La fluorescence des cellules est mesurée grâce au canal FL-1 correspondant à l'illumination du FITC. Les données obtenues sont ensuite analysées grâce au logiciel d'analyse FlowJo_V10.

6. Immunoblot

- **Anticorps**

Les western-blots sont réalisés en utilisant les anticorps: anti-MAP17 et anti-CAP24 proviennent du NIH Aids reagent program (respectivement, antisérum contre HIV-1p17 VU47 issu du lapin et HIV-1p24Gag Monoclonal #24-4 de souris), souris anti-Cdc42 (ACD03) [Cytoskeleton], lapin anti-Wave2 (D2C8), chèvre anti-IRSp53 (W-20), chèvre anti-Dia1 (C-20) and souris anti-Arp3 [Santa-Cruz Biotechnologies], souris anti-Lamp2 (human lysosomal-associated membrane protein 2) (H4B4) [SantaCruz Biotechnologies], les anticorps secondaires anti-souris, anti-lapin et anti-chèvre couplés à horseradish peroxidase (HRP) [Dako], anti-GAPDH couplé HRP [Sigma]

- **Préparation des échantillons**

- Purification des particules virales

Les surnageants viraux sont récoltés 24h ou 48h post-transfection et centrifugés à 4°C à 2000rpm, 5minutes et 4000rpm, 5minutes afin de culotter les débris cellulaires. Le surnageant est récolté et un volume équivalent pour chaque condition est déposé sur un coussin de sucrose 25% dans du TNE1X (25mM Tris-HCl, 4mM EDTA, 150mM NaCl) et ultracentrifugé pendant 1h30 dans le rotor Beckman MLA150 à 56'000rpm, 4°C. Le culot viral est resuspendu dans du TNE1X + β-mercaptoéthanol pour analyse par western-blot.

- Préparation des échantillons cellulaires

Les cellules sont récoltées 24 ou 48h post-transfection et rincées au PBS1X. Puis les cellules sont culotées par centrifugation 10min à 800rpm, 4°C. Le culot est resuspendu dans du RIPA (tampon de lyse Sigma - ref G9295) puis lysé par sonication selon un cycle de 7 min (30 secondes ON / 10 secondes OFF) par un Bioruptor. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 13500rpm, 10min, 4°C. Le surnageant est utilisé pour doser la quantité totale de protéine par Bradford. 50µg de protéines totales sont utilisées pour l'analyse par western blot.

- Western-blot

Pour l'analyse western-blot, 20µL de surnageant viral purifié ou 50µg de protéines sont déposés et séparés sur un gel de SDS-PAGE 10% d'acrylamide. Les échantillons cellulaires des cellules exprimant Gag-(i)mEOS2 sont séparés sur un gel de SDS-page 8%. Le transfert est réalisé sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluorure) [ThermoFischer] dans un tampon de Tris-glycine 1X + 15% Methanol. L'immunomarquage est ensuite réalisé à l'aide des anticorps correspondant. La révélation de la chemiluminescence est révélée à l'aide du substrat SuperSignal West Pico ou Femto [ThermoFischer] et détecté à l'aide d'une caméra CCD [GBox, Syngene, Synoptics].

➤ Quantification

La quantification des bandes obtenues sont réalisées avec le logiciel ImageJ. La production virales est estimé relativement à la quantité du témoin de charge (GADPH): I_{SV} =intensité du surnageant viral / I_{blanc} =intensité du bruit de fond de la membrane / I_{EC} =intensité de l'échantillon cellulaire / I_{GADPH} =intensité du témoin de charge

$$\% \text{ production virale} = \frac{I_{SV} - I_{blanc}}{\left(\frac{I_{EC}}{I_{GADPH}} - I_{blanc}\right) + (I_{SV} - I_{blanc})} \times 100$$

La quantification des flottaisons de membrane est réalisée comme suit: $I_{1/2/3}$ =intensité des fractions 1, 2 et 3 (figure 1) / I =intensité des bandes révélées en WB

$$\% \text{ accrochage membranaire} = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{\sum_1^8 I} \times 100$$

7. Microscopie

- **Microscopie confocale**

➤ Anticorps

Pour les marquages en immunofluorescence, les anticorps suivant sont utilisés : anti-MAp17 et anti-CAP24 [NIH, USA], la F-actine est marquée par la Phalloïdine-Alexa546 (2U/ml) [Invitrogen],

➤ Préparation d'échantillons

Les cellules Jurkat sont récoltées 24h après transfection. Elles sont rincées dans du PBS1X puis mises à adhérer 30-40min à 37°C sur des lamelles en verre préalablement traitées à la poly-L-Lysine. Les cellules sont fixées pendant 15min à température ambiante dans 3% PFA dans du PBS puis rincées à température ambiante pendant 5min dans 50mM NH_4Cl . La perméabilisation est réalisée pendant 5min à température ambiante dans 0.2% TritonX-100. La saturation est réalisée pendant 10min dans 1% BSA/PBS. Les cellules sont marquées avec les anticorps primaires pendant 1h à température ambiante puis rincées trois fois dans 1%BSA/PBS. Les anticorps secondaires dirigés contre les espèces des anticorps primaires sont mis en présence des cellules pendant 1h à température ambiante. Puis les cellules sont rincées trois fois PBS avant d'être montées sur lame dans du ProlongGold + DAPI.

➤ Acquisition et analyse :

Les acquisitions sont réalisées grâce au microscope confocal Zeiss LSM780 multi-photon sur statif inversé. L'objectif utilisé est 63x/1.4 OIL DIC Plan-Apo. Le logiciel d'acquisition est Zen. Les acquisitions sont analysées grâce au logiciel ImageJ/Fiji.

- **PALM**

- Préparation d'échantillons

Les Jurkat sont rincées au PBS puis mises à adhérer pendant 30-45min à 37°C sur lamelle en verre 1.5H préalablement traitées à la polyLysine. Les cellules sont ensuite fixées à la PFA3% dans du PBS pendant 15minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution de NH₄Cl 50mM pendant 5min. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS1X pH7 puis conservées dans du PBS. Jute avant l'acquisition, les cellules sont rincées une fois avec du milieu de microscopie (150mM NaCl, 20mM HEPES pH7,4, 1mM CaCl₂, 5mM KCl, 1mM MgCl₂ - pH 7-7.4) avant d'être mise en présence du milieu de microscopie auquel les billes tetraspeck 0.2µm ont été ajoutées extemporanément.

- Acquisition

Les cellules sont acquises grâce à une illumination constante à 647nm de l'ordre du W/cm². Les images sont acquises à une fréquence de 30Hz grâce à une caméra emCCD. Le logiciel d'acquisition est NIS développé par Nikon.

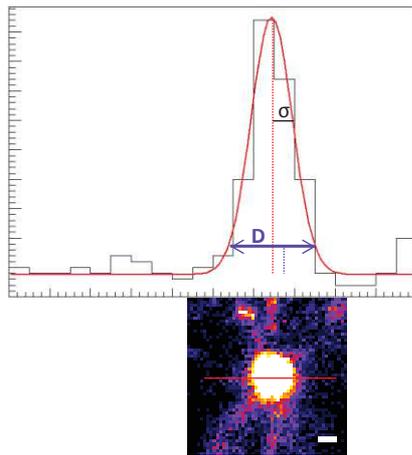
- Reconstruction des images

Les piles d'images sont transformées en tiff grâce au logiciel Fiji et découpées en sous-stacks de 2000 images/stack. Ces stacks sont ensuite analysées grâce au plugin PALM_Tracer développé par [Izzedin et al., 2012] via le logiciel MetaMorph. Le mouvement de la bille est d'abord suivi (maximum distance autorisée d'un image à une autre = 2 pixel). Chaque molécule est ensuite localisée grâce au même logiciel via une décomposition par ondelette et un ajustement gaussien isotrope (fit x,y,σ), prenant directement en compte le mouvement de la bille. Le seuil imposé pour réaliser le masque de l'image est adapté à chaque acquisition.

- Analyse

Les plateformes sont détectées grâce à la fonction *Cluster Analysis* de PALM_Tracer. L'ajustement gaussien réalisé est anisotrope (fit $x,y, \sigma_x, \sigma_y, \theta$). Le seuil imposé est de 3.

Le diamètre des plateformes d'assemblage est calculé à partir d'un ajustement gaussien anisotrope sur les clusters de Gag (figure 12.A). Autrement dit, le cluster est associé à une structure arrondie dont la taille le long de l'axe x peut être différent de celle en y. On considère que le diamètre du cluster est proche du diamètre à 10% de la hauteur de la gaussienne. Le niveau basal de localisations autour du cluster, associé aux premiers 10%, ne sont donc pas pris en compte. Cette approximation nous permet d'être au plus près de la taille réelle de la plateforme d'assemblage considérée. Afin de calculer ce diamètre, on utilise les paramètres σ_x et σ_y , sachant que le paramètre σ correspond au rayon à 60% de la hauteur totale de la gaussienne en x ou en y. La sphéricité des plateformes est obtenu en faisant le rapport σ_x / σ_y . Le calcul du diamètre est représenté ci-dessous :



σ = rayon à 60% de la gaussienne

$$r(x)_{10\% \text{ gauss}} = 2.14 \times \sigma_x \quad [\mu m]$$

$$r(y)_{10\% \text{ gauss}} = 2.14 \times \sigma_y \quad [\mu m]$$

$$S_{10\% \text{ gauss}} = 3.14 \times r(x) \times r(y) \quad [\mu m^2]$$

$$D_{10\% \text{ gauss}} = 1000 \times 2 \times \sqrt{\frac{S_{10\% \text{ gauss}}}{3.14}} \quad [nm]$$

Figure 1: Schéma de l'ajustement gaussien utilisé pour calculer le diamètre des plateformes d'assemblage. Une plateforme telle qu'elle apparaît en image de super-résolution PALM est représentée en bas. Pour plus de clarté, une plateforme sphérique a été sélectionnée. Pour les paramètres du fit gaussien, voir dans le texte. Le trait rouge représente la section à partir de laquelle le fit gaussien est réalisé. Le graphique situé en haut représente le fit gaussien : en noir le nombre de localisations par pixel et en rouge l'ajustement par la gaussienne. Le centre de la gaussienne est représenté par une trait rouge en pointillés. Le paramètre σ et le diamètre D calculé selon les équations situées à droite sont représentés sur l'ajustement. Le diamètre D correspond au diamètre à 10% de la gaussienne

- **sptPALM**

- Préparation d'échantillons

Les jurkat exprimant Gag-(i)mEOS2 sont récoltées et rincées dans du PBS chaud 18 à 24h après transfection. Les cellules sont ensuite récupérées dans du tampon de microscopie chaud (150mM NaCl, 20mM HEPES pH7,4, 1mM CaCl₂, 5mM KCl, 1mM MgCl₂ - pH 7-7.4). Une solution de billes 0.2 μ m (tetraSpeck) sont ajoutées à la solution extemporanément. Les cellules sont laissées à adhérer 15-20min sur des lamelles préalablement traitées polyLysine dans une étuve 37°C, 5%CO₂.

- Acquisition

Les cellules sont acquises à 37°C avec un objectif 100x1.45 NA PL-APO et un système *perfect focus* Nikon. Les acquisitions sont réalisées avec illumination constante à 561 de l'ordre du mW/cm². L'activation des molécules est réalisée grâce à des puissances variables de 405nm de l'ordre du μ W/cm². Les images sont acquise à une fréquence de 50Hz grâce à une caméra emCCD grâce au logiciel MetaMorph et au plugin Wave_Tracer développé par J.B Sibarita et al. 20 séries de 4000 images sont imagées.

- Analyse

- *Analyse MetaMorph*

- Reconstruction des localisations et des trajectoires

Les images basse résolution dans le vert en plein champs sont analysées sur ImageJ. La cellule est sélectionnée pour réaliser un masque permettant de mesurer l'intensité totale de la cellule.

Les images de sptPALM sont analysées grâce au plugin PALM_Tracer développé par [Izzedin et al., 2012] grâce au logiciel MetaMorph. Le mouvement de la bille est d'abord suivi (distance maximum autorisée d'une image à une autre = 2 pixel). Le suivi des protéines est ensuite réalisé en prenant directement en compte le mouvement intrinsèque du système.

- Extraction des coefficients de diffusion

Les trajectoires sont analysées après leur reconstruction. Les trajectoires d'au moins 10 points temps contenues dans la cellule sont utilisées et l'histogramme des coefficients de diffusion sont extraits: Dcoef minimum = 10^{-5} , Dcoef maximum = $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 100 bins. 100% des trajectoires doivent être contenues dans la cellule (région d'intérêt sélectionnée) pour être considérée. On obtient donc le nombre d'occurrences de Dcoef par bin. Ce nombre est normalisé par le nombre total de coefficients de diffusion extraits (et donc de trajectoires analysées).

- Décomposition linéaire

La décomposition linéaire est réalisée via le logiciel Matlab grâce à un programme écrit par le Dr. Cyril Favard permettant de décomposer les distributions ainsi obtenues à partir des distributions des contrôles de mobilité CAAX et VLPs. La portion immobile est bornée entre $5 \cdot 10^{-5}$ et $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. La portion mobile est bornée entre 1 et $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Les bornes de la décomposition linéaire sont choisies arbitrairement pour que l'ajustement soit le plus adapté par rapport au Gag-(i)mEOS2 WT puis sont gardés fixes pour analyser les autres conditions.

→ *Analyse Matlab/InferenceMAP*

- Reconstruction des localisations et des trajectoires

Les images de super-résolution sont transformées en une seule pile d'image .tiff en virtual stack grâce à ImageJ. Les protéines sont ensuite localisées et suivies avec le logiciel SLIMfast via le logiciel Matlab développé par Dr. Mohamed El Beheiry. Les trajectoires sont ensuite triées grâce à un algorithme créé par Dr. Mohamed El Beheiry et Dr. Jean-Baptiste Masson. Le seuil est imposé à 99% (99% de la trajectoire doit avoir un comportement confiné pour être associée à l'état 0 correspondant à l'état immobile). Les trajectoires ainsi obtenues dans l'état 1 sont ensuite découpées en fenêtres temporelles de 240 secondes avec une superposition temporelle de 120 secondes (carte 1 : 0-240secondes ; carte 2 : 120-360sec ; carte 3 : 240-480sec etc.) grâce à un programme Matlab écrit par Dr. Mohammed El Beheiry.

- Création des cartes d'inférence

L'énergie potentiel, la force, la diffusivité et la densité de localisations sont ensuite analysées à partir des trajectoires via le logiciel InferenceMap [El Beheiry et al., 2015]. Une région de $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ contenant le bourgeon viral est sélectionnée. Le meshing imposé est réalisé par une tessellation de Voronoï. Le nombre de zone est adapté pour avoir au minimum 10 localisations

par zone de mesh. La méthode d'inférence utilisée est D,V (infère la diffusivité et le gradient de potentiel)

- Analyse des cartes

De l'inférence sont extraites des cartes converties en niveaux de gris sur ImageJ. A partir du centre de la plateforme d'assemblage, les niveaux de gris (image de 0-1024) sont intégrés par un disque de diamètre croissant de 1 à 200 pixels de diamètre (itération de 1 pixel) grâce à une macro ImageJ créée par Dr. Cyril Favard. Ces valeurs sont ensuite rapportées au maximum de l'échelle des niveaux de gris pour obtenir les fluctuations d'énergie, de diffusion et de nombre de localisations.

- Automatisation

Le Dr. JB Masson nous envoie les analyses d'inférence automatisées sous forme de matrices Matlab contenant le temps d'évolution de chaque plateforme, le nombre de localisations considérées pour chaque mesh, et les différentiels d'énergie et de diffusivité. Dr. Cyril Favard a écrit un programme permettant d'extraire pour chaque plateforme le ΔE_{\max} et la durée du processus d'assemblage. La proportion des fractions d'énergies (figure 37 des résultats) est réalisé grâce à l'analyse statistique des distributions grâce au logiciel Origine v8.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol.* 2010 Oct; 84(19):9864-78.
2. Accola, M.A., Strack, B. & Gottlinger, H.G. Efficient particle production by minimal gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J. Virol.* 74, 5395–5402(2000).
3. Agostini I, Navarro JM, Rey F, Bouhamdan M, Spire B, Vigne R, Sire J. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIIB. *J Mol Biol.* 1996, 261: 599-606
4. Aiken C, Trono D. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol.* 1995 Aug;69(8):5048-56.
5. Akari H., Fukumori T, Adachi A. Cell-dependant requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *J.Virol* 2000 ; 74(10), 4891-4893
6. Alfadhli A, McNett H, Tsagli S, Bächinger HP, Peyton DH, Barklis E. HIV-1 matrix protein binding to RNA. *J Mol Biol.* 2011 Jul 22;410(4):653-66
7. Alfadhli A, R L Barklis, E Barklis. HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate, *Virology* 2009, 387,2, 466:472
8. Alfadhli A, Still A, Barklis E Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *J Virol* 2009 ; 83:12196–12203
9. Aloia RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *PNAS* 1993 ; 90:5181–5185
10. Amarasinghe G.K, J.Zhoua, M.Miskimona, K.J. Chancellor, J.A. McDonalda, A.G. Matthews, Robyn R. Millera, Michael D. Rousea, Michael F. Summers; Stem-loop SL4 of the HIV-1 Ψ RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J.Mol.Biol* 2001; 314,5;961-970
11. Anderson, E.C.; Lever, A.M.L. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J. Virol.* 2006, 80, 10478–10486
12. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD, Conrad TP, Lempicki RA, McLaughlin S, Pascuccio M, Gopaul R, McNally J, Cruz CC, Censoplano N, Chung E, Reitano KN, Kottlilil S, Goode DJ, Fauci AS. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(3):301-9.
13. Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 1989;30:245-70.
14. Ayyavoo V, Mahboubi A, Mahalingam S, Ramalingam R, Kudchodkar S, Williams WV, Green DR, Weiner DB. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med.* 1997, 3: 1117-1123
15. Barros M, Heinrich F, Datta S.A.K, Rein A., Karageorgos I, Nanda H, Lösche M. Membrane Binding of HIV-1 Matrix Protein: Dependence on Bilayer Composition and Protein Lipidation. *J. Virol.* 2016 ;90(9), 4544-4555
16. Baumgart F, Andreas M Arnold, Konrad Leskovar, Kaj Staszek, Martin Fölser, Julian Weghuber, Hannes Stockinger, Gerhard J Schütz Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters. *Nature Methods* 2016, 13, 661–664
17. Beatriz Apellániz, Edurne Rujas, Soraya Serrano, Koldo Morante, Kouhei Tsumoto, Jose M. M. Caaveiro, M. Ángeles Jiménez and José L. Nieva The Atomic Structure of the HIV-1 gp41 Transmembrane Domain and Its Connection to the Immunogenic Membrane-proximal External Region. *J.Biol.Chem* 2015, 290, 12999-13015.
18. Bennett AE, Narayan K, Shi D, Hartnell LM, Gousset K, He H, Lowekamp BC, Yoo TS, Bliss D, Freed EO, Subramaniam S.. Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS pathogens* 2009 ; 5:e1000591

BIBLIOGRAPHIE

19. Berman PW, Nunes WM, Haffar OK. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 in vitro and in continuous cell lines. *J Virol.* 1988 Sep; 62(9):3135-42
20. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 2006, 313(5793):1642-5.
21. Bleck M, Itano MS, Johnson DS, Thomas VK, North AJ, Bieniasz PD, Simon SM. Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *PNAS* 2014 ; 111(33), 12211-12216
22. Blot G, Janvier K, Le Panse S, Benarous R, Berlioz-Torrent C. Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. *Virol.* 2003 Jun;77(12):6931-45.
23. Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, Martinelli N, Effantin G, Hulsik DL, Belly A, Goldberg Y, Chatellard-Causse C, Blot B, Schoehn G, Weissenhorn W, Sadoul R. Charged Multivesicular Body Protein 2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) Polymerizes into Helical Structures Deforming the Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry,* 2011; 286: 40276–40286
24. Bolinger C, Boris-Lawrie K.. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology* 2009, 6: 8
25. Booth A/M, Fang Y., Fallon J.K, Yang Jr-M., Hildreth J.E.K, Gould S.J. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T-cell plasma membrane. *JCB* 2006 ; 176(6), 923-935
26. Bosco DA1, Eisenmesser EZ, Clarkson MW, Wolf-Watz M, Labeikovskiy W, Millet O, Kern D, Dissecting the microscopic steps of the cyclophilin A enzymatic cycle on the biological HIV-1 capsid substrate by NMR. *J Mol Biol.* 2010 Nov 12;403(5):723-38.
27. Bouamr F, Scarlata S, Carter C. Role of myristoylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry* 2003; 42, 6408-6417
28. Bowzard JB, Bennett RP, Krishna NK, Ernst SM, Rein A, , Wills JW..Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J Virol* 1998 72:9034–9044.
29. Briggs J.A.G. & H.G Kraüsslich, The molecular Architecture of HIV, *Journal of molecular Biology* 2011, 410: 491-500
30. Briggs JA, Simon MN, Gross I, Kräusslich HG, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:672–675.
31. Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G. & Fuller, S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 2003, 22, 1707–1715.
32. Brik A, Wong CH: HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem.* 2003, 1: 5-14
33. Browne E.P., Allers, C., and Landau, N.R. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology* 2009; 387: 313–321
34. Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich HG. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *PNASU S A.* 2006 21;103(8):2641-6.
35. Brügger B, Krautkrämer E, Tibroni N, Munte CE, Rauch S, Leibrecht I, Glass B, Breuer S, Geyer M, Kräusslich HG, Kalbitzer HR, Wieland FT, Fackler OT. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology.* 2007 1;4:70.
36. Bukrinskaya, A. G. HIV-1 assembly and maturation. *Arch. Virol.* 2004 149, 1067–1082.
37. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley GW, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *PNASUSA.* 1993;90:6125–6129

BIBLIOGRAPHIE

38. Burniston MT, Cimarelli A, Colgan J, Curtis SP, Luban J. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* 1999 ; 73:8527–8540.
39. Campbell S, Fisher RJ, Towler EM, Fox S, Issaq HJ, Wolfe T, Phillips LR, Rein A. Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *PNAS* 2001;98,10875-10879
40. Cashikar, A. G. et al. Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *eLife* 2014, 3, e02184
41. Cassan E, Arigon-Chifolleau AM, Mesnard JM, Gross A, Gascuel O. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *PNAS U S A*. 2016 Oct 11;113(41):11537-11542
42. Chamontin C, Rassam P, Ferrer M, Racine PJ, Neyret A, Lainé A, Milhiet PE, Mougél M. HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. *Nucleic Acid Res* 2015 ; 43(1), 336-347
43. Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W, Wenk MR. Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol* 2008 ; 82:11228–11238
44. Charlier L, Louet M, Chaloin L, Fuchs P, Martinez J, Muriaux D, Favard F, Floquet N. Coarse-Grained Simulations of the HIV-1 Matrix Protein Anchoring: Revisiting Its Assembly on Membrane Domains. *Biophysical J*. 2014 ; 106(3), 577-585
45. Chatel-Chaix L, Abrahamyan L, Fréchina C, Moulard AJ, DesGroseillers L. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol*. 2007 Jun; 81(12):6216-30
46. Checkley M.A, Luttge BG, Soheilian, Nagashima, Freed EO. The capsid-spacer peptide 1 Gag processing intermediate is a dominant-negative inhibitor of HIV-1 maturation. *Virology* 2010; 400, 137–144
47. Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*. 2011 Jul 22;410(4):582-608.
48. Checkley MA, Luttge BG, Mercredi PY, Kyere SK, Donlan J, Murakami T, Summers MF, Cocklin S, Freed EO. Reevaluation of the requirement for TIP47 in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein incorporation. *J Virol*. 2013;87(6):3561-70.
49. Chen AK, Sengupta P, Waki K, Van Engelenburg SB, Ochiya T, Ablan SD, Freed EO, Lippincott-Schwartz J. MicroRNA binding to the HIV-1 Gag protein inhibits Gag assembly and virus production. *PNAS* 2014 Jul 1;111(26):E2676-83
50. Chen H, Engelman A. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *PNAS*. 1998;95:15270–15274.
51. Chen J, David Grunwald, Luca Sardo, Andrea Galli, Sergey Plisov, Olga A. Nikolaitchik, De Chen, Stephen Lockett, Daniel R. Larson, Vinay K. Pathak, and Wei-Shau Hu Cytoplasmic HIV-1 RNA is mainly transported by diffusion in the presence or absence of Gag protein. *PNAS* 2014, 111(48), E5205-13
52. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, De Clercq E, Debysers Z. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 2003 278:372–381.
53. Chowes, M. Y., Pandori, M. W., Spina, C. A., Richman, D. D, Guatelli, J. C. The growth advantage conferred by HIV-1 nef is determined at the level of viral DNA formation and is independent of CD4 downregulation. *Virology*, 1995; 212, 451–457
54. Chukkapalli V, Hogue I.B., Boyko V, Hu W.S., Ono A, Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding; *J. Virol*. 2008 ; 82(5) 2405-2417
55. Chukkapalli V, S J. Oh, A Ono1 Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *PNAS* 2010; 107(4), 1600-1605

BIBLIOGRAPHIE

56. Cimarelli A., Sandini S., Höglund S., Lunban J. Basic residues in Human Immunodeficiency Virus type-1 Nucleocapsid promotes virion assembly via interaction with RNA. *J.Virol* 2000 ; 74(7), 3046-3057
57. Cimarelli, A., Darlix, J.L. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol. Life Sci.* 2002; 59, 1166–1184
58. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 1995 Jan 27; 267(5197):483-9.
59. Collins K.L., Chen B.K., Kalams S.A., Walker B.D., Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1998;391:397–401
60. Conticello S.G., R.S. Harris, M.S. Neuberger. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G/ *Curr. Biol.*, 2003. 13;22 2009–2013
61. Coren LV, Thomas JA, Chertova E, Sowder RC 2nd, Gagliardi TD, Gorelick RJ, Ott DE.. Mutational analysis of the C-terminal gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2007 ; 81:10047–10054.
62. Damgaard CK, Andersen ES, Knudsen B, Gorodkin J, Kjems J, "RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome". *J Mol Biol* 2004, 336 (2): 369–379
63. Darlix JL, Marcelo Lopez Lastra, Yves Mély, Bernard Roques, Nucleocapsid Protein Chaperoning of Nucleic Acids at the Heart of HIV Structure, Assembly and cDNA Synthesis, HIV database, last modification May 2013
64. Das, K., Balzarini, J., Miller, M.T., Maguire, A.R., DeStefano, J.J., Arnold, E. Conformational States of HIV-1 Reverse Transcriptase for Nucleotide Incorporation vs Pyrophosphorolysis-Binding of Foscarnet. *Acs Chem.Biol.* 2016
65. Datta S A. K., Patrick K. Clark, Lixin Fan, Buyong Ma, Demetria P. Harvin, Raymond C. Sowder II, Ruth Nussinov, Yun-Xing Wang, Alan Rein. Dimerization of the SP1 Region of HIV-1 Gag Induces a Helical Conformation and Association into Helical Bundles: Implications for Particle Assembly. *J. Virol.* 2016 ; 90(4) 1773-1787
66. Datta S.A.K, J.E.Curtis, W.Ratcliff, P.K.Clark, R.M.Crist, J.Leboitz, S.Krueger, A. Rein. Conformation of the HIV-1 Gag protein in Solution. *J.Mol.Biol* 2007; 365(3):812-824
67. Datta S.A.K., Z. Zhao, P.K. Clark, S. Tarasov, J.N. Alexandratos, S.J. Campbell, M. Kvaratskhelia, J. Lebowitz, A. Rein. Interaction between HIV-1 Gag Molecules in solution : an inositol phosphate-mediated switch. *J.Mol.Biol* 2007; 365(3):799-811
68. Datta SA, Temeselew LG, Crist RM, Soheilian F, Kamata A, Mirro J, Harvin D, Nagashima K, Cachau RE, Rein A. On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J Virol* 2011;85:4111–4121
69. Daugherty MD, D'Orso I, Frankel AD. . A solution to limited genomic capacity: Using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol Cell* 2008 31: 824–834
70. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N., Summers, M.F. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 1998; 279: 384-388
71. De Marco A, A-M Heuser, B. Glass, H-G Kräusslich, B. Müller and J.A. G. Briggs. Role of the SP2 Domain and Its Proteolytic Cleavage in HIV-1 Structural Maturation and Infectivity. *J. Virol.* 2012 ; 86(24):13708-13716
72. del Alamo, M., Neira, J.L. & Mateu, M.G. Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *J. Biol. Chem.* 278, 27923–27929 (2003)
73. Demirov D.G, Orenstein J.M, Freed E.O. The Late Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 Promotes Virus Release in a Cell Type-Dependent Manner. *J. Virol.* 2002, 76,1, 105-117
74. Derdowski A, Ding L, Spearman P. A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag–Gag interactions. *J Virol* 2004;78:1230–42.

BIBLIOGRAPHIE

75. Dick R.A, Goh S.L, Feigenson G.W, Vogt V.M. HIV-1 Gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *PNAS* 2012 ; 109(46), 18761-18766
76. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA, Valerio R. . Human immunodeficiency virus 1 Tat protein binds transactivation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *PNAS* 1989 86:6925–6929.
77. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA. . HIV-1 Tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* 1990 9: 4145–4153
78. Dobrowsky TM, Zhou Y, Sun SX, Siliciano RF, Wirtz D. Monitoring early fusion dynamics of human immunodeficiency virus type 1 at single-molecule resolution. *J Virol.* 2008;82(14):7022-33.
79. Dooher JE, Schneider BL, Reed JC, Lingappa JR. Host ABCE1 is at plasma membrane HIV assembly sites and its dissociation from Gag is linked to subsequent events of virus production. *Traffic.* 2007; 8(3):195-211.
80. Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin JA, de La Cruz J, Nagashima K, Bouamr F. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog.* 2009 ;5(3):e1000339
81. Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *PNAS* 1990 Jan; 87(2):648-52
82. Effantin G, Dordor A, Sandrin V, Martinelli N, Sundquist WI, Schoehn G, Weissenhorn W. ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cell Microbiol.* 2013;15(2):213-26
83. El Beheiry M, Dahan M, Masson JB. InferenceMAP: mapping of single-molecule dynamics with Bayesian inference. *Nat Methods.* 2015;12(7):594-5.
84. El Meshri SE, Denis Dujardin, Julien Godet, Ludovic Richert, Christian Boudier, Jean Luc Darlix, Pascal Didier, Yves Mély, , Hugues de Rocquigny. 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.* 2015 ; 427(6):1480-94
85. Engelman & P. Cherepanov. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology* 2012, 10, 279-290
86. Esposito F, Angela Corona, and Enzo Tramontano. HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Molecular Biology International*, 2012, 586401
87. Faivre-Moskalenko C, Bernaud J, Thomas A, Tartour K, Beck Y, Iazykov M, Danial J, Lourdin M, Muriaux D, Castelnovo M. RNA control of HIV-1 particle size polydispersity. *PLoS One.* 2014 Jan 24;9(1):e83874.
88. Farnet C, Bushman FD. HIV-1 cDNA Integration: Requirement of HMG I(Y) Protein for Function of Preintegration Complexes In Vitro. *Cell.* 1997;88:1–20.
89. Fledderman EL1, Fujii K, Ghanam RH, Waki K, Prevelige PE, Freed EO, Saad JS, Myristate exposure in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is modulated by pH. *Biochemistry.* 2010; 9;49(44):9551-6
90. Fogarty K.H, Yan Chen, Iwen F. Grigsby, Patrick J. Macdonald, k Elizabeth M. Smith, Jolene L. Johnson, Jonathan M. Rawson, Louis M. Mansky, and Joachim D. Mueller. Characterization of Cytoplasmic Gag-Gag Interactions by Dual-Color Z-Scan Fluorescence Fluctuation Spectroscopy *Biophys J.* 2011 ;100(6):1587-95
91. Fossen T, V Wray, K Bruns, J Rachmat, P Henklein, U Tessmer, A Maczurek, P Klinger, U Schubert. Solution Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 Protein. *JBC* 2005; 280, 42515-42527
92. Freed E.O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 2015,13, 484–496
93. Friedrich M, Setz C, Hahn F, Matthaehi A, Fraedrich K, Rauch P, Henklein P, Traxdorf M, Fossen T, Schubert U. Glutamic Acid Residues in HIV-1 p6 Regulate Virus Budding and Membrane Association of Gag. *Viruses.* 2016;8(4):117

BIBLIOGRAPHIE

94. Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV Nuclear Import is Governed by the Phosphotyrosine-mediated Binding of Matrix to the Core Domain of Integrase. *Cell*.1995;17:569–576
95. Gamble, T.R. et al. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278, 849–853 (1997).
96. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18(2):203-17.
97. Gaya K Amarasinghea, Roberto N, De Guzman, Ryan B Turnera, Kalola J Chancellora, Zeng Rong Wua, Michael F Summers, NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the Ψ -RNA packaging signal : implications for genome recognition. *J.Mol.Biol.*, 2000;301,2;491:511
98. Gerber PP, Cabrini M, Jancic C, Paoletti L, Banchio C, von Bilderling C, Sigaut L, Pietrasanta LI, Duette G, Freed EO, Basile Gde S, Moita CF, Moita LF, Amigorena S, Benaroch P, Geffner J, Ostrowski M. 2015. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of cell biology* 2015; 676 209:435-452.
99. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure–function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*. 2001 Jul;2(7):580-5
100. Gheysen D, Jacobs E, De foresta F, Thiriart C, Francotte M, Tines D, De Wilde M. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55Gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 1989; 59, 103-112
101. Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H., and Emerman, M. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med*. 1998; 4: 65–71
102. Goldsmith MA, Warmerdam MT, Atchison RE, Miller MD, Greene WC. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol*. 1995; 69(7):4112-21.
103. Göttlinger HG, T Dorfman, J G Sodroski, W A Haseltine. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *PNAS*, 1991; 88(8): 3195–3199
104. Gottwein, E.; Krausslich, H.G. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J. Virol*. 2005, 79, 9134–9144
105. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. The Trojan exosome hypothesis. *PNAS* 2003 ; 100(19):10592-7
106. Grigorov B, Arcanger F, Roingard P, Darlix JL, Muriaux D. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* 2006;359:848–62.
107. Grigorov B, Decimo D, Smagulova F, Pechoux C, Mougél M, Muriaux D, et al. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* 2007;4:54.
108. Grigorov B, Decimo D, Smagulova F, Pechoux C, Mougél M, Muriaux D, Darlix JL. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* 2007 4:54
109. Gross I, Hohenberg H, Wilk T, Wiegers K, Grättinger, Müller B, Fuller S, Kräusslich, HG. A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *EMBO J* 2000; 19:103–113
110. Guo X, Roldan A, Hu J, Wainberg MA, Liang C. . Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 2005; 79:1803–1812
111. Gurer, C.; Berthoux, L.; Luban, J. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J. Virol*. 2005, 79, 910–917.
112. Haffar OK, Dowbenko DJ, Berman PW. Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J Cell Biol*. 1988 Nov; 107(5):1677-87
113. Hahn, F.; Setz, C.; Friedrich, M.; Rauch, P.; Solbak, S.M.; Froystein, N.A.; Henklein, P.; Votteler, J.; Fossen, T.; Schubert, U. Mutation of the highly conserved Ser-40 of the HIV-1 p6 gag protein to Phe causes the

BIBLIOGRAPHIE

- formation of a hydrophobic patch, enhances membrane association, and polyubiquitination of Gag. *Viruses* 2014, 6, 3738–3765.
114. Hahn, S.; Setz, C.; Wild, J.; Schubert, U. The PTAP sequence within the p6 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates its ubiquitination and MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* 2011, 186, 5706–5718
 115. Hanson PI, Shim S, Merrill SA. Cell biology of the ESCRT machinery. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009; 21: 568–574
 116. Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 2010 ; 464:232–236
 117. Hemonnot, B.; Cartier, C.; Gay, B.; Rebuffat, S.; Bardy, M.; Devaux, C.; Boyer, V.; Briant, L. The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 32426–32434
 118. Hendrix J, Baumgärtel V, Schrimpf W, Ivanchenko S, Digman MA, Gratton E, Kräusslich HG, Müller B, Lamb DC Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J Cell Biol.* 2015; 210(4):629-46.
 119. Hermida-Matsumoto L, Resh MD. Localization of Human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J. Virol* 2000; 74,8670-8679
 120. Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M., Sundquist, W.I. , Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996, 93: 3099-3104
 121. Hogue I.B, Grover J.R, Soheilian F, Nagashima K, Ono A. Gag Induces the Coalescence of Clustered Lipid Rafts and Tetraspanin-Enriched Microdomains at HIV-1 Assembly Sites on the Plasma Membrane. *J. Virol.* 2011 vol. 85(19), 9749-9766
 122. Hogue IB, Hoppe A, Ono A. Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J Virol* 2009, 83:7322–7336
 123. Holmes, R.K., Malim, M.H., and Bishop, K.N. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32: 118–128
 124. Hubner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK. Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol* 2007;81:12596–607.
 125. Huthoff, H.; Berkhout, B. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* 2001, 7, 143–157
 126. Inlora J, V Chukkapalli, S Bedi and A Ono. The molecular determinants directing HIV-1 Gag assembly to the virus-containing compartments in primary macrophages. *J. Virol* 2016 ; 01004-16.
 127. Ivanchenko S William J. Godinez, Marko Lampe, Hans-Georg Kräusslich, Roland Eils, Karl Rohr, Christoph Bräuchle, Barbara Müller , Don C. Lamb. Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLoS Pathog.* 2009;5(11):e1000652
 128. Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, CG., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan, M., Sibarita, JB. Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics Express.* 2012, 30;20(3);2081-95.
 129. Jacks, T.; Power, M.D.; Masiarz, F.R.; Luciw, P.A.; Barr, P.J.; Varmus, H.E. Characterisation of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 1988, 336, 403–405.
 130. Janvier K, Pelchen-Matthews A, Renaud JB, Caillet M, Marsh M, Berlioz-Torrent C. The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS Pathog.* 2011 3;7(2):e1001265
 131. Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol.* 1998, 143: 875-885

BIBLIOGRAPHIE

132. Jewell, N., and L. Mansky. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J. Gen. Virol.* 2000 81:1889-1899.
133. Jin, J.; Sturgeon, T.; Weisz, O.A.; Mothes, W.; Montelaro, R.C. HIV-1 Matrix dependent membrane targeting is regulated by Gag mRNA trafficking. *PLoS ONE* 2009, 4, e6551.
134. John M. A. Grime, James F. Dama, Barbie K. Ganser-Pornillos, Cora L. Woodward, Grant J. Jensen, Mark Yeager & Gregory A. Voth. Coarse-grained simulation reveals key features of HIV-1 capsid self-assembly. *Nature Communications* 2016, 7, Article number:11568
135. Johnson, M.C., Scobie, H.M., Ma, Y.M. & Vogt, V.M. Nucleic acid-independent retrovirus assembly can be driven by dimerization. *J. Virol.* 76, 11177–11185(2002).
136. Jones KS, Coleman J, Merkel GW, Laue TM, Skalka AM. Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J Biol Chem* 1992 ; 267:16037–16040
137. Joseph S.B., K.T Arrildt, C.B. Sturdevant, R. Swanstorm, HIV-1 target cells in the CNS, *J. Neurovirol.* 2015;21(3):276-289
138. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *PNAS U S A.* 2009 Nov 10;106(45):19114-9
139. Jouvenet N, Sanford M. Simon, Paul D. Bieniasz. Visualizing HIV-1 Assembly. *J Mol Biol.* 2011; 410(4):501-11
140. Jouvenet, N., S. Neil, C. Bess, M. Johnson, C. Virgen, S. Simon, and P. Bieniasz. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 2006; 4:2296-2310.
141. Jouvenet, N.; Simon, S.M.; Bieniasz, P.D. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *PNAS* 2009, 106, 19114–19119
142. Julien, J.P., Cupo, A., Sok, D., Stanfield, R.L., Lyumkis, D., Deller, M.C., Klasse, P.J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Ward, A.B., Wilson, I.A. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. (2013) *Science* 342: 1477-1483
143. Kaplan, A. H., Manchester, M., and Swanstrom, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J. Virol.*1994; 68, 6782–6786.
144. Karn J. and C. M. Stoltzfus. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011
145. Kenyon, J.C.; Tanner, S.J.; Legiewicz, M.; Phillip, P.S.; Rizvi, T.A.; Le Grice, S.F.J.; Lever, A.M.L. SHAPE analysis of the HIV Leader RNA reveals a structural switch potentially controlling viral packaging and genome dimerization. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 6692–6704
146. Kestler HW , Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* 1991 May 17;65(4):651-62.
147. Kim S, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: Evidence for differential gene expression. *J Virol* 1989 63: 3708–3713.
148. Konvalinka J, Litterst MA, Welker R, Kottler H, Rippmann F, Heuser AM, Krausslich HG: An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity. *J Virol.* 1995, 69: 7180-7186
149. Kudoh, A.; Takahama, S.; Sawasaki, T.; Ode, H.; Yokoyama, M.; Okayama, A.; Ishikawa, A.; Miyakawa, K.; Matsunaga, S.; Kimura, H.; et al. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology* 2014, 11
150. Kudoh, S Takahama, T Sawasaki, H Ode, M Yokoyama, A Okayama, A Ishikawa, K Miyakawa, S Matsunaga, H Kimura, W Sugiura, H Sato, H Hirano, S Ohno, N Yamamoto, A Ryo. The phosphorylation of

BIBLIOGRAPHIE

- HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 2014; 11: 9.
151. Kutluay SB, Bieniasz PD. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001200.
152. Kutluay, S B.; Zang, T; Blanco-Melo, D; Powell, C; Jannain, D; Errando, M; Bieniasz, P D. Global Changes in the RNA Binding Specificity of HIV-1 Gag Regulate Virion Genesis. *Cell*, 2014 159(5):1096-1109
153. Larson DR, Ma YM, Vogt VM, Webb WW. Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J Cell Biol* 2003;162:1233–44.
154. Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehle J, Gottlinger HG, Weissenhorn W. Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science*, 2008; 321: 1354–1357.
155. Lau KA., J.J.L Wong, Current trends of HIV recombination worldwide, *Infectious disease reports* 2013;volume 5:s1e4
156. Leblanc J, Weil J, Beemon K. Posttranscriptional regulation of retroviral gene expression: primary RNA transcripts play three roles as pre-mRNA, mRNA, and genomic RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013 ;4(5):567-80.
157. Leonard JA, Filzen T, Carter CC, Schaefer M, Collins KL. HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that share common elements. *J Virol*. 2011 Jul; 85(14):6867-81
158. Llano M, Vanegas M, Fregoso O, Saenz D, Chung S, Peretz M, Poeschla EM. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol*. 2004;78:9524–9537.
159. Llewellyn GN, Grover JR, Olety B, Ono A. 2013. HIV-1 Gag associates with specific uropod- directed microdomains in a manner dependent on its MA highly basic region. *Journal of virology* 87:6441-6454.
160. Llewellyn GN, Hogue IB, Grover JR, Ono A. 2010. Nucleocapsid promotes localization of HIV-1 gag to uropods that participate in virological synapses between T cells. *PLoS pathogens* 6:e1001167.
161. Lopez-Vergès S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, Berlioz-Torrent C. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *PNAS* 2006 ; 103(40):14947-52.
162. Lorizate M, Timo Sachsenheimer, Bärbel Glass, Anja Habermann, Mathias J. Gerl, Hans-Georg Kräusslich, and Britta Brügger Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines; *Cellular Microbiology* 2013; 15(2), 292–30
163. Lu, K, Heng X, Summers MF, Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging". *Journal of Molecular Biology* 2011 410 (4): 609–33
164. Luban, J. TRIM5 and the regulation of HIV-1 infectivity. *Mol Biol Int*. 2012;2012:426840
165. M Huang, J M Orenstein, M A Martin, E O Freed. p6 Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J.Virol*. 1995; 69(11) 6810-6818
166. Malim MH, Hauber J, Le S-Y, Maizel JV, Cullen BR. . The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989 338: 254–257
167. Manley S., Gillette JM, Patterson GH, Shroff H, Hess HF, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature methods* 2008, 5,2, 155-157
168. Manley S., Gillette JM, Lippincott-Schwartz J. Single particle tracking Photoactivated Localization microscopy for mapping single-molecule dynamics. *Methods Enzymol* 2010, 475, 109-120

BIBLIOGRAPHIE

169. Mann DA, Mikaélian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, Kimura T, Singh M, Butler PJG, Gait MJ, Karn J. . A molecular rheostat: Co-operative Rev binding to Stem I of the Rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J Mol Biol* 1994 241: 193–207
170. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*. 1998 ;1(4):565-74.
171. Masson JB, Dionne P, Salvatico C, Renner M, Specht CG, Triller A, Dahan M. Mapping the energy and diffusion landscapes of membrane proteins at the cell surface using high-density single-molecule imaging and Bayesian inference: application to the multiscale dynamics of glycine receptors in the neuronal membrane. *Biophys J*. 2014 Jan 7;106(1):74-83.
172. Matusali G, Potestà M, Santoni A, Cerboni C, Doria M. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. *J Virol*. 2012 ;86(8):4496-504
173. Matusali G., Potesta M., Santoni A., Cerboni C., Doria M. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. *J. Virol*. 2012;86:4496–4504
174. Maudet C, Bertrand M, Le Rouzic E, Lahouassa H, Ayinde D, Nisole S, Goujon C, Cimorelli A, Margottin-Goguet F, Transy C. Molecular insight into how HIV-1 Vpr protein impairs cell growth through two genetically distinct pathways. *J Biol Chem*. 2011;286(27):23742-52.
175. McCutchan F.R, Understanding the genetic diversity of HIV-1, *AIDS* 2000; 14 Suppl 3:S31-44
176. McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.*, 2002 159, 441-452
177. Meng X, Zhao G, Yufenyuy E, Ke D, Ning J, Delucia M, Ahn J, Gronenborn AM, Aiken C, Zhang P. Protease cleavage leads to formation of mature trimer interface in HIV-1 capsid. *PLoS Pathog* 2012; 8(8):e1002886
178. Michael Kogan and Jay Rappaport - HIV-1 Accessory Protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention - *Retrovirology* 2011;8:25
179. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, Toth MV, Marshall GR, Clawson L, Selk L, Kent SB, Wlodawer A: Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science*. 1989, 246: 1149-1152
180. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes: Studies of Organization and Composition. *J Virol*. 1997;71:5382–5390
181. Mizuno H, Mal T, Tong KI, Ando R, Furuta T, Ikura M, Miyawaki A. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Mol. Cell* 2003, 12, 1051-1058.
182. Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, Marsh M. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol* 2013; 11:89.
183. Molle D, Segura-Morales C, Camus G, Berlioz-Torrent C, Kjemis J, Basyuk E, Bertrand E. Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *J Biol Chem*. 2009 Jul 17;284(29):19727-43
184. Monaco-Malbet Stéphanie, Carmen Berthet-Colominas, Amelle Novelli, Nicole Battaï, Nadia Piga, Valérie Cheynet, François Mallet, Stephen Cusack, Mutual Conformational Adaptations in Antigen and Antibody upon Complex Formation between an Fab and HIV-1 Capsid Protein p24, *Structure* 2000 Volume 8, Issue 10, 2000, 1069–1077
185. Moon HS, Yang JS: Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol Cells*. 2006, 21: 7-20.
186. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*. 2011 Mar 17;9(3):235-42
187. Moulard AJ, Mercier J, Luo M, Bernier L, DesGroseillers L, Cohen EA. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol*. 2000 Jun; 74(12):5441-51.

BIBLIOGRAPHIE

188. Müller B, M. Anders, H. Akiyama, S. Welsch, B. Glass, K. Nikovics, F. Clavel, H.-M. Tervo, O. T. Keppler, H.-G. Kräusslich. HIV-1 Gag processing intermediates trans-dominantly interfere with HIV-1 infectivity. *J. Biol. Chem.* 2009; 284, 29692–29703
189. Muller, B.; Patschinsky, T.; Krausslich, H.G. The late-domain-containing protein p6 is the predominant phosphoprotein of human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 2002, 76, 1015–1024
190. Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease. *J Virol* 2004 ; 78, 1026-1031
191. Murakami T, Freed E.O. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell-type dependant manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *PNAS*, 2000 ; 97, 343-348
192. Murakami T, Freed E.O. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dépendant manner of HIV-1 envelope incorporation into virions. *PNAS* 2000 ; 97(1), 343-348
193. Muriaux D, Darlix JL. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol.* 2010;7(6):744-53.
194. Muriaux D, J. Mirro, D. Harvin, and A. Rein. RNA is a structural element in retrovirus particles. *PNAS* 2001; 98(9), 5246–5251
195. Muthumani, K., Choo, A.Y., Premkumar, A., Hwang, D.S., Thieu, K.P., Desai, B.M., and Weiner, D.B. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 962–970
196. Naif HM, Pathogenesis of HIV infection, *Infectious Disease Reports* 2013; volume 5:s1e6
197. Neil SJ., Zang T., Bieniasz PD., Tetherin inhibit retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 2008; 451, 425-430
198. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(52):52347-54
199. Nieva, J.L.; Madan, V.; Carrasco, L. Viroporins: Structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10, 563–574.
200. Nikolaitchik O.A, Dille K.A, Fu W., Gorelick R.J, Tai S.H.S, Soheilian F., Ptak R.G, Nagashima K, Pathak V.K., Hu W.S. Dimeric RNA recognition regulates HIV-1 genome packaging. *PLOSPath* 2013 ; 9(3), e1003249
201. Nydegger S, Foti M, Derdowski A, Spearman P, Thali M. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic.* 2003;4(12):902-10.
202. O'Carroll IP, Rachael M. Crist, Jane Mirro, Demetria Harvin, Ferri Soheilian, Anne Kamata, Kunio Nagashima and Alan Reina Functional Redundancy in HIV-1 Viral Particle Assembly *J.Virol* 2012, 86, 23, 12991-12996
203. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *PNAS* 2004;101:14889– 14894
204. Ono A, E.O. Freed, Cell-type dependant targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J. virol.* 2004, 78, 1552-1563
205. Ono A, Freed E.O. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane : role of the matrix amini terminus. *J.Virol* 1999; 73,4136-4144
206. Ono A. HIV-1 assembly at the plasma embrane : Gag trafficking and localization. *Future virol.* 2009; 4, 241-257
207. Ono A. Relationship between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol. Cell.* 2010; 102, 335-350
208. Ono A, Freed EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *PNAS* 2001 ; 98:13925–13930

BIBLIOGRAPHIE

209. Ott DE, Coren LV, Shatzer T. The nucleocapsid region of human immunodeficiency virus type 1 Gag assists in the coordination of assembly and Gag processing: role for RNAGag binding in the early stages of assembly. *J Virol* 2009;83:7718–27
210. Ott, D., L. Coren, and T. Gagliardi. Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* 2005 79:13839-13847
211. Ott, D.E.; Coren, L.V.; Chertova, E.N.; Gagliardi, T.D.; Schubert, U. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 2000, 278, 111–121.
212. Ott, D.E.; Coren, L.V.; Copeland, T.D.; Kane, B.P.; Johnson, D.G.; Sowder, R.C., 2nd; Yoshinaka, Y.; Oroszlan, S.; Arthur, L.O.; Henderson, L.E. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 1998, 72, 2962–2968
213. Ovesný M., P. Křížek, J. Borkovec, Z. Švindrych, G. M. Hagen. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plugin for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* 2014, 30(16):2389-2390.
214. Paillart JC, Shehu-Xhilaga M, Marquet R, Mak J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2, 461-472
215. Paillart JC, Skripkin E, Ehresmann B, Ehresmann C, Marquet R, In vitro evidence for a long range pseudoknot in the 5'-untranslated and matrix coding regions of HIV-1 genomic RNA. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (8): 5995–6004
216. Pearl L, T. Blundell. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 1984, 174; 96–101
217. Peeters M., P.M Sharp, Genetic diversity of HIV-1: the moving target, *AIDS* 2000;14 Suppl 3:S129-40
218. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *The Journal of cell biology* 2003; 162:443-455.
219. Perlman M, Resh MD. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic.* 2006;7(6):731-45.
220. Peter D. Kwong, Richard Wyatt, James Robinson, Raymond W. Sweet, Joseph Sodroski, Wayne A. Hendrickson. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659
221. Pomerantz RJ, Trono D, Feinberg MB, Baltimore D. Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: A molecular model for latency. *Cell* 1990 61: 1271–1276
222. Pornillos O, Barbie K. Ganser-Pornillos & Mark Yeager, Atomic-level modelling of the HIV capsid, *Nature* 2011, vol 469
223. Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K. & Yeager, M. Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 2011, 469, 424–427
224. Pujol FM, Laketa V, Schmidt F, Mukenhirn M, Müller B, Boulant S, Grimm D, Keppler OT, Fackler OT. HIV-1 Vpu Antagonizes CD317/Tetherin by Adaptor Protein-1-Mediated Exclusion from Virus Assembly Sites. *J Virol.* 2016; 90(15):6709-23
225. Purohit P, Dupont S, Stevenson M, Green MR. Sequence-specific interaction between HIV-1 matrix protein and viral genomic RNA revealed by in vitro genetic selection. *RNA* 2001; 7:576–584
226. Qi M, Williams JA, Chu H, Chen X, Wang JJ, Ding L, Akhirome E, Wen X, Lapierre LA, Goldenring JR, Spearman P. Rab11-FIP1C and Rab14 direct plasma membrane sorting and particle incorporation of the HIV-1 envelope glycoprotein complex. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003278.
227. Qian, H, Sheetz, MP and Elson, EL. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* 1991, 60: 910–921.

BIBLIOGRAPHIE

228. Radestock, B.; Morales, I.; Rahman, S.A.; Radau, S.; Glass, B.; Zahedi, R.P.; Muller, B.; Krausslich, H.G. Comprehensive mutational analysis reveals p6Gag phosphorylation to be dispensable for HIV-1 morphogenesis and replication. *J. Virol.* 2013, 87, 724–734.
229. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 2002 ; 3:718-729.
230. Reil H, Bukovsky AA, Gelderblom HR, Göttlinger HG. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J* 1998 ; 17:2699–2708
231. Rhodes, T., H. Wargo, and W. S. Hu.. High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J. Virol* 2003. 77:11193-11200
232. Rivière L, Darlix JL, Cimorelli A. Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *J Virol.* 2010;84(2):729-39.
233. Robinson BA, Reed JC, Geary CD, Swain JV, Lingappa JR. A temporospatial map that defines specific steps at which critical surfaces in the Gag MA and CA domains act during immature HIV-1 capsid assembly in cells. *J Virol.* 2014 May;88(10):5718-41
234. Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol.* 2004 Dec 6; 167(5):903-13.
235. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature.* 2015;526(7572):212-7
236. Rosé S., P. Hensley, D. J. O'Shannessy, J. Culp, C. Debouck, I. Chaiken Characterization of HIV-1 p24 self-association using analytical affinity chromatography. *Proteins.* 1992 Apr;13(2):112-119
237. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol.* 1999 Jun 17; 9(12):613-21
238. Rulli SJ, CS Hibbert, J Miro, T Pederson, S. Biswal, A. Rein. Selective and non-selective packaging of cellular RNAs in retroviral particles. *J. Virol* 2007; 81:6623-6631
239. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) *Nat. Methods.* 2006;3:793–795
240. Ruthardt N, Lamb DC, Bräuchle C. Single-particle tracking as a quantitative microscopy-based approach to unravel cell entry mechanisms of viruses and pharmaceutical nanoparticles. *Mol Ther.* 2011 Jul;19(7):1199-211
241. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *PNAS* 2006 Jul 25;103(30):11364-9.
242. Sakai J., K., Dimas, J., and Lenardo, M. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 3369–3374
243. Salgado GF, Marquant R, Vogel A, Alves ID, Feller SE, Morellet N, Bouaziz S. Structural studies of HIV-1 Gag p6ct and its interaction with Vpr determined by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* 2009; 48(11):2355-67
244. Salvatico C, Specht CG, Triller A. Synaptic receptor dynamics: from theoretical concepts to deep quantification and chemistry in cellulo. *Neuropharmacology.* 2015;88:2-9.
245. Sanchez-Madrid F, Serrador JM. 2009. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:353-359.
246. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Gally PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol.* 2001 ;75(19):9187-200.

BIBLIOGRAPHIE

247. Sarafianos S. G., Bruno Marchand, Kalyan Das, Daniel Himmel, Michael A.Parniak, Stephen H. Hughes, and Eddy Arnold. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol* 2009 January 23; 385(3): 693–713
248. Sardo L, Hatch SC, Chen J, Nikolaitchik O, Burdick RC, Chen D, Westlake CJ, Lockett S, Pathak VK, Hu WS. Dynamics of HIV-1 RNA Near the Plasma Membrane during Virus Assembly. *J Virol.* 2015 Nov;89(21):10832-40.
249. Saxton, MJ and Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997, 26: 373–399.
250. Schroder A.R, P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J.R. Ecker, F. Bushman, HIV- 1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots, *Cell*, 110 (2002), pp. 521–529
251. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.* 1996 Mar; 2(3):338-42
252. Schwartz O., Marechal V., Danos O., Heard J.M. Human immunodeficiency virus type1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.*, 1995; 69, 4053–4059
253. Schwartz S, Felber B.K, Fenyo E.M, Pavlakis G.N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* 1990, 64, 5448–5456
254. Sebla B. Kutluay, Paul D. Bieniasz. Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. *Plos Pathogens*, 2010, 6(11)
255. Sergé A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D.. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Methods* 2008, 5(8): 687-694.
256. Sette, P., Nagashima, K., Piper, R. C. & Bouamr, F. Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology* 2013;10, 79
257. Shah A.H., Sowrirajan B., Davis Z.B., Ward J.P., Campbell E.M., Planelles V., Barker E. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe*.2010;8:397–409
258. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, Mothes W. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic.* 2003;4(11):785-801
259. Sherer NM, Swanson CM, Papaioannou S, Malim MH (2009) Matrix mediates the functional link between human immunodeficiency virus type 1 RNA nuclear export elements and the assembly competency of Gag in murine cells. *J Virol* 2009 ; 83:8525–8535.
260. Shimomura o, johnson fh, saiga y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 1962 ;59:223-39.
261. Shkriabai N, Datta SA, Zhao Z, Hess S, Rein A, Kvaratskhelia M. Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. *Biochemistry.* 2006 Apr 4;45(13):4077-83.
262. Shoeman RL, Honer B, Stoller TJ, Kesselmeier C, Miedel MC, Traub P, Graves MC: Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein. *PNASU S A.* 1990, 87: 6336-6340.
263. Shoeman RL, Huttermann C, Hartig R, Traub P: Amino-terminal polypeptides of vimentin are responsible for the changes in nuclear architecture associated with human immunodeficiency virus type 1 protease activity in tissue culture cells. *Mol Biol Cell.* 2001, 12: 143-154.
264. Shoeman RL, Sachse C, Honer B, Mothes E, Kaufmann M, Traub P: Cleavage of human and mouse cytoskeletal and sarcomeric proteins by human immunodeficiency virus type 1 protease. Actin, desmin, myosin, and tropomyosin. *Am J Pathol.* 1993
265. Sibarita JB. High-density single-particle tracking: quantifying molecule organization and dynamics at the nanoscale. *Histochem Cell Biol.* 2014 Jun;141(6):587-95.

BIBLIOGRAPHIE

266. Siliciano RF, Greene WC. . HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011,
267. Sougrat R, Bartesaghi A, Lifson JD, Bennett AE, Bess JW, Zabransky DJ, Subramaniam S. Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog.* 2007 4;3(5):e63.
268. Spinelli S, Liu QZ, Alzari PM, Hirel PH, Poljak RJ: The three-dimensional structure of the aspartyl protease from the HIV-1 isolate BRU. *Biochimie.* 1991, 73: 1391-1396
269. Stefan W. Hell and Jan Wichmann, Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Opt. Lett.*, 1994, 19, 780-782
270. Stolp B, Abraham L, Rudolph JM, Fackler OT. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *J Virol.* 2010 Apr;84(8):3935-48
271. Stolp B, Reichman-Fried M, Abraham L, Pan X, Giese SI, Hannemann S, Goulimari P, Raz E, Grosse R, Fackler OT. HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell Host Microbe.* 2009 Aug 20;6(2):174-86
272. Stopak K., C. de Noronha, W. Yonemoto, W.C. Greene. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell*, 2003 ; 12;3 591–601
273. Strebel K. HIV Accessory Proteins versus Host Restriction Factors *Curr Opin Virol.* 2013 Dec; 3(6): 10.
274. Stuchell MD, Garrus JE, Müller B, Stray KM, Ghaffarian S, McKinnon R, Kräusslich HG, Morham SG, Sundquist WI. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):36059-71
275. Stys, D., Blaha, I., and Strop, P. Structural and functional studies in vitro on the p6 protein from the HIV-1 gag open reading frame. *Biochim. Biophys. Acta* 1993. 1182(2), 157–161
276. Swanstrom R., J.W. Wills. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, NY 1997
277. Tang C, Y. Ndassa & M. F. Summers, Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein, *Nature Structural Biology* 2002; 9, 537 – 543
278. Tang, C. et al. Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein. *Nat. Struct.Biol.*, 2002 9, 537–543
279. Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., Summers, M.F. , Entropic Switch Regulates Myristate Exposure in the HIV-1 Matrix Protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2004 101:517
280. Tedbury PR, Novikova M, Ablan SD, Freed EO. Biochemical evidence of a role for matrix trimerization in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *PNAS* 2016 ; 113(2), e182-90
281. Todd MJ, Semo N, Freire E: The structural stability of the HIV-1 protease. *J Mol Biol.* 1998, 283: 475-488.
282. Tokunaga M, Kitamura K, Saito K, Hikikoshi Iwane A, Yanagida T, Single Molecule Imaging of Fluorophores and Enzymatic Reactions Achieved by Objective-Type Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 235, 1, 47-53.
283. Tomasselli AG, Hui JO, Adams L, Chosay J, Lowery D, Greenberg B, Yem A, Deibel MR, Zurcher-Neely H, Henrikson RL: Actin, troponin C, Alzheimer amyloid precursor protein and pro-interleukin 1 beta as substrates of the protease from human immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 1991, 266: 14548-14553
284. Torresilla C., Larocque E, Landry S, Halin M, Coulombe Y, Masson J.Y, Mesnard J.M and Barbeau B. Detection of the HIV-1 Minus-Strand-Encoded Antisense Protein and Its Association with Autophagy. *J. Virol.* 2013, 87, 9, 5089-5105
285. Toth G, Borics A: Flap opening mechanism of HIV-1 protease. *J Mol Graph Model.* 2006, 24: 465-474
286. Trono D, Carine Van Lint, Christine Rouzioux, Eric Verdin, Françoise Barré-Sinoussi, Tae-Wook Chun, Nicolas Chomont; HIV Persistence and the Prospect of Longterm Drug-Free remissions for HIV-Infected Individuals, *Science* 2010, 329, 174

BIBLIOGRAPHIE

287. Turner, B.G., Summers, M.F. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 1999 ; 285, 1–32
288. Urano E, Ablan SD, Mandt R, Pauly GT, Sigano DM, Schneider JP, Martin DE, Nitz TJ, Wild CT, Freed EO, Alkyl Amine Bevirimat Derivatives Are Potent and Broadly Active HIV-1 Maturation Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 19;60(1):190-7
289. Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature.* 2015;526(7572):218-23
290. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):245-52
291. Ventoso I, Navarro J, Munoz MA, Carrasco L: Involvement of HIV-1 protease in virus-induced cell killing. *Antiviral Res.* 2005, 66: 47-55.
292. Von Schwedler UK, Melissa Stuchell, Barbara Müller, Diane M. Ward, Hyo-Young Chung, Eiji Morita, Hubert E. Wang, Thaylon Davis, Gong-Ping He, Daniel M. Cimbora, Anna Scott, Hans-Georg Kräusslich, Jerry Kaplan, Scott G. Morham, Wesley I. Sundquist. The Protein Network of HIV Budding. *Cell* 2003, 114(6):701-13.
293. Von Schwedler, U.K. Stray KM, Garrus JE, Sundquist W. Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J. Virol.* 2003; 77,5439–5450
294. Votteler, J.; Neumann, L.; Hahn, S.; Hahn, F.; Rauch, P.; Schmidt, K.; Studtrucker, N.; Solbak, S.M.; Fossen, T.; Henklein, P.; et al. Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology* 2011, 8
295. Wagner R, Fliessbach H, Wanner G, Motz G, Niedrig M, Deby G, von Brunn A, Wolf H: Studies on processing, particle formation and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol.* 1992, 127: 117-137
296. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM, Architecture and Secondary Structure of an Entire HIV-1 RNA Genome. *Nature* 2009, 460 (7256): 711–6.
297. Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Salih A, Spindler K.D, Nienshaus U. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *PNAS* 2004, 101, 15905-15910
298. Willey, R.L.; Maldarelli, F.; Martin, M.A.; Strebel, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 1992, 66, 7193–7200.
299. Wong HC1, Shin R, Krishna NR. Solution structure of a double mutant of the carboxy-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Biochemistry.* 2008 Feb 26;47(8):2289-97
300. WorthyLake, D.K., Wang H, Yoo S, Sundquist WI, Hill CP. Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 angstrom resolution. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 1999, 55, 85–92
301. Wu,X., Li,Y., Crise,B., Burgess,S.M. and Munroe,D.J. Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J. Virol.*, 2005 79, 5211-5214
302. Yang Hailiu , Joseph Nkeze and Richard Y Zhao. Effects of HIV-1 protease on cellular functions and their potential applications in antiretroviral therapy. *Cell & Bioscience*2012 2:32
303. York A, Kutluay SB, Errando M, Bieniasz PD. The RNA Binding Specificity of Human APOBEC3 Proteins Resembles That of HIV-1 Nucleocapsid. *PLoS Pathog.* 2016 Aug 19;12(8):e1005833.
304. Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.F. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science.* 2003; 302: 1056–1060
305. Yuan X, Yu X, Lee TH, Essex M. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol.* 1993; 67(11):6387-94.

BIBLIOGRAPHIE

306. Zhang, Y.Q., Qian, H.Y., Love, Z. & Barklis, E. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J. Virol.* 72,1782–1789 (1998).
307. Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. 1996. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *PNASUSA* 1996 ; 93:13659–13664
308. Zhou D, Mei Q, Li J, He H, Cyclophilin A and viral infections. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2012 424, 647–650
309. Zhu P, Chertova E, Bess J Jr, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions *PNASU S A.* 2003 Dec 23; 100(26):15812-7

Annexes

Annexe 1 : Publication de l'image du mois dans le journal AIDS research and human retroviruses

Mariani-Floderer C, Sibarita JB, Favard C, and Muriaux D. **Hunting Down HIV-1 Gag Proteins at the Plasma Membrane of Human T Lymphocytes.** AIDS Research and Human Retroviruses. June 2016, 32(7): 658-659

- Section "Images in HIV Research" accompagné de 500 mots explicatifs :
 - o réalisation des images
 - o proposition de texte corrigé par Dr. Delphine Muriaux, Dr. Cyril Favard et Dr. Jean-Baptiste Sibarita

+

Réalisation de la couverture de l'édition de Juillet 2016 du journal AIDS Research and human retroviruses

- Réalisation de l'image

Hunting Down HIV-1 Gag Proteins at the Plasma Membrane of Human T Lymphocytes

Charlotte Mariani-Floderer,¹ Jean-Baptiste Sibarita,² Cyril Favard,¹ and Delphine M. Muriaux¹

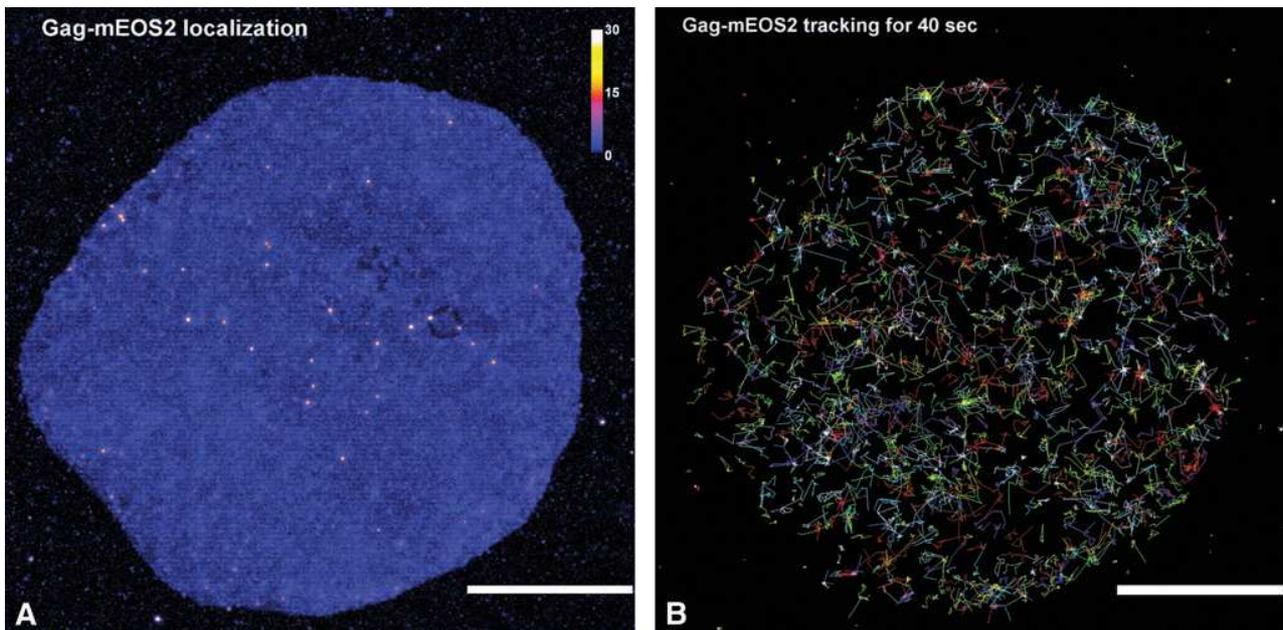


FIG. 1. (A) A living Jurkat T cells-expressing HIV-1 Gag-i(mEOS2) 24 h post-transfection is shown. The PALM/TIRF image of Gag-i(mEOS2)-expressing Jurkat T cells corresponds to the sum of all Gag-i(mEOS2) localizations, the color scale corresponds to the number of localizations per pixel. The resolution is 50 nm. The total number of localizations is 17.8×10^6 . The color scale bar indicates Gag localization density: single molecule Gag (close to “zero” value, blue color), small assembly complexes (close to “15” value, magenta color), and assembled particles (“30” value, white color). Scale bar is 5 μm . (B) The sum of reconstructed Gag-i(mEOS2) trajectories for 40 s in a Jurkat cell (1490 trajectories represented) is shown. The total number of trajectories for the time of acquisition is 1.1×10^6 . One Gag molecule trajectory is represented by one color. Scale bar is 5 μm . PALM, photo-activable localization microscopy; TIRF, total internal reflection fluorescence. Color images available online at www.liebertpub.com/aid

NEWLY FORMED HIV-1 PARTICLES are one of the possible targets for an efficient cure against AIDS. It is therefore important to understand at a single molecule level how assembly is occurring in living CD4 T lymphocytes, the main host cells for HIV-1 replication. HIV-1 Gag has been shown to be the most important component for virus assembly as it is sufficient to produce newly formed particles, called virus-like particles (VLPs). Assembly of retroviral Gag proteins is mainly occurring at the inner leaflet of the infected cell plasma membrane.¹ Interestingly, Gag can be tagged inter-

nally by a fluorescent protein without impairing its capacity to assemble into a VLP.^{2,3} Therefore, we are currently deciphering VLP assembly at the plasma membrane of human T lymphocytes by monitoring the dynamic organization of Gag-i(mEOS2) protein, at the nanometric level, with the help of single-protein tracking photo-activable localization microscopy (spt-PALM) coupled to total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy.

This super-resolution microscopy method⁴ produces high-resolution images (Fig. 1A) where assembly platforms made

¹Centre des agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, CNRS & Montpellier University, Montpellier, France.

²Institut Interdisciplinaire des Neurosciences de Bordeaux, CNRS, Bordeaux University, Bordeaux, France.

of Gag-i(mEOS2) are distinguishable as areas enriched in Gag proteins. Using that type of image, we can monitor the mean number of assembling sites occurring after 18 to 24 h of viral protein expression. On average we observed between 100 and 250 assembly platforms per cell. Since we are performing time lapse experiments, we can also determine the mean time of existence of these assembly platforms inside the cell. We find it in between 6 and 15 min, which corresponds to what Ivanchenko et al.² and Jouvenet et al.³ found in human adherent HeLa cells expressing GFP-tagged Gag. Interestingly, as an advantage of the method, we can identify and characterize the final step of the process by observing some VLPs released in the extracellular medium. These VLPs are ~100–140 nm in diameter and do not exhibit any dynamic or evolution in time, which is a signature of an achieved particle.

Spt-PALM⁴ also allows to study the time-resolved evolution of the assembly, molecule after molecule at the nanoscale level (~50 nm), that is, with a resolution higher than the virus assembly platform size of 110–140 nm in diameter. The total number of localizations for the entire acquisition time is in the order of 10⁷ per cell, leading to ~10⁵ to 10⁶ analyzable trajectories. By tuning acquisition frequency, we can select mainly slow diffusing proteins ($D < 2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), that is, membrane-associated proteins. Thus, by reconstructing images of the different Gag trajectories (Fig. 1B), we can identify Gag proteins getting trapped into the assembly sites as well as others freely diffusing at the cell plasma membrane of Jurkat T cells (transposable to primary CD4 T lymphocytes). We are currently analyzing these trajectories using newly developed tools and big data facilities to give access to new molecular details about HIV-1 Gag assembly dynamic in

its natural host cells and to improve our knowledge about the late stages of HIV-1 replication in CD4 T lymphocytes.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Mariani C, Desdouts M, Favard C, Benaroch P, Muriaux DM: Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4(+) T cells and macrophages. *Front Microbiol* 2014;5:312.
2. Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Krausslich HG, Eils R, Rohr K, Brauchle C, Muller B, Lamb DC: Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000652.
3. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD: Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19114–19119.
4. Sibarita JB: High-density single-particle tracking: Quantifying molecule organization and dynamics at the nanoscale. *Histochem Cell Biol* 2014;141:587–595.

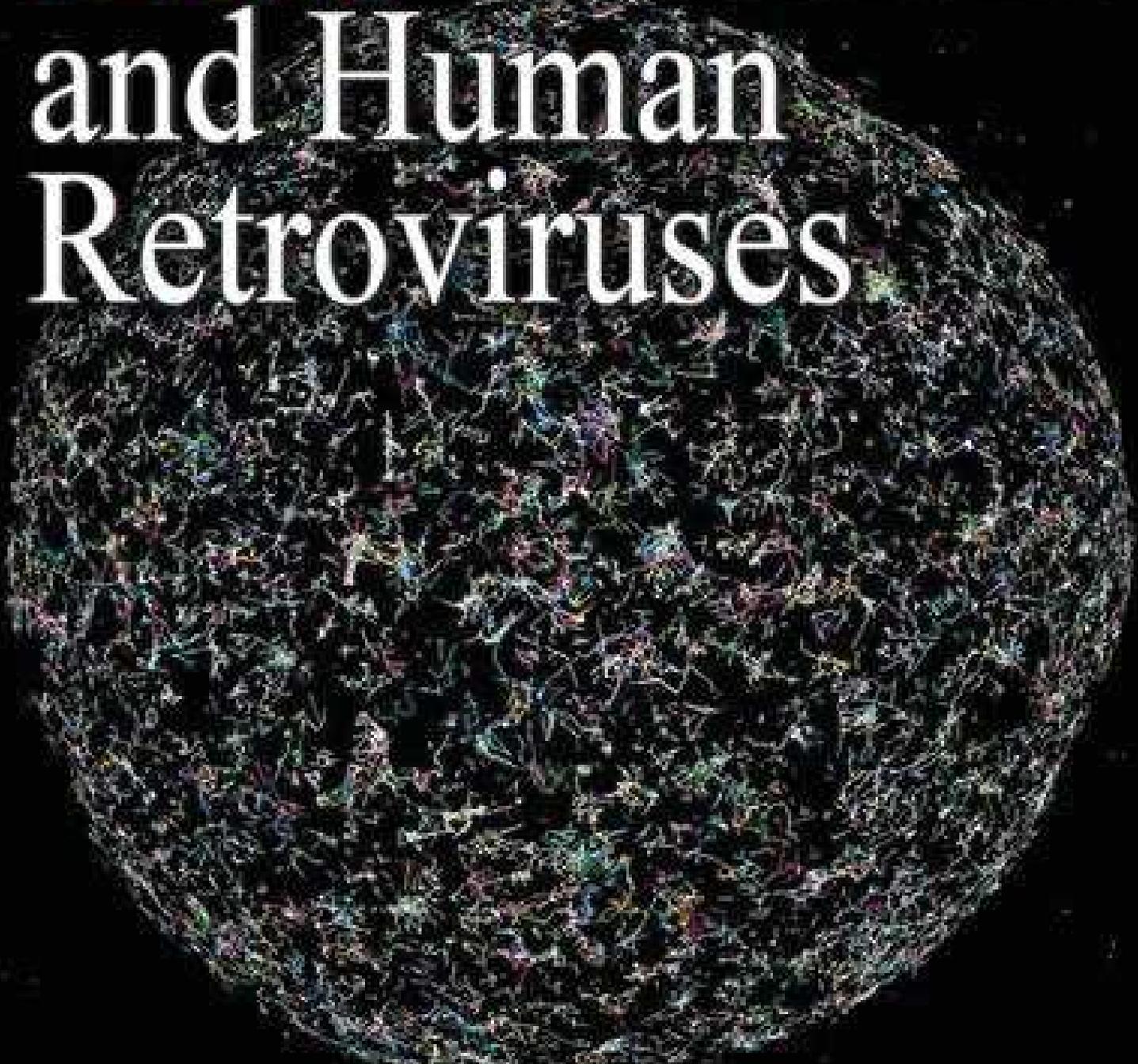
Address correspondence to:

*Delphine M. Muriaux
Centre des agents Pathogènes et
Biotechnologies pour la Santé
CNRS & Montpellier University
1919 route de Mende
Montpellier 34293
France*

E-mail: delphine.muriaux@cpbs.cnrs.fr

Volume 32 Number 7 • July 2016 • ISSN: 0889-3129

AIDS Research and Human Retroviruses



Mary Ann Liebert, Inc. is publishers
www.liebertpub.com/aid

Annexe 2 : Contribution à la publication d'un article sur l'implication de la voie de signalisation IRSp53/Wave2/Arp2-3 dans la production virale dans les Lymphocytes T (fin du projet doctoral du Dr. Audrey Thomas)

Thomas A, Mariani-Floderer C, López-Huertas MR, Gros N, Hamard-Péron E, Favard C, Ohlmann T, Alcamí J, Muriaux D. **Involvement of the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 Signaling Pathway in HIV-1 Gag Particle Release in CD4 T Cells.** *J. Virol.* August 2015 vol. 89 no. 16 8162-8181

Contribution au papier :

- Réalisation des contrôles supplémentaires demandés par les reviewers :
 - Flottaison de membrane p8.2 + siRac1 / p8.2 + siRhoA (figure 1 - K et L)
 - Vérification que la production virale mesurée représente des VLP et non des débris cellulaires par la mesure de la production de VLP par Gag vs MACA (figure 4 E et F)
- Etude de l'effet synergique des protéines IRSp53/Wave2 dans la production virale : mise au point de la double inhibition d'IRSp53 et Wave2 par siRNA
- Etude de l'effet de la double inhibition d'IRSp53 et Wave2 par siRNA sur la localisation cellulaire de Gag en lymphocytes T Jurkat et PBL par microscopie confocale (figure 8)
- Etude de la localisation relative de Gag/IRSp53/Wave2 en Jurkat par SIM (structured illuminated microscopy) : non représenté car résultats non concluant

Perspectives du papier : étude de l'implication de la F-actine dans l'assemblage du VIH-1

- Mise au point du protocole dSTORM/PALM en Jurkat

Involvement of the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 Signaling Pathway in HIV-1 Gag Particle Release in CD4 T Cells

Audrey Thomas,^{b,d} Charlotte Mariani-Floderer,^b Maria Rosa López-Huertas,^{c,d} Nathalie Gros,^b Elise Hamard-Péron,^d Cyril Favard,^b Theophile Ohlmann,^{a,d} José Alcamí,^c Delphine Muriaux^{b,d}

CIRI, INSERM U1111, Lyon, France^a; Centre d'Études d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS UMR5236, Montpellier, France^b; Unidad de Inmunopatología del SIDA, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; ENS de Lyon, Lyon, France^d

ABSTRACT

During HIV-1 assembly, the Gag viral proteins are targeted and assemble at the inner leaflet of the cell plasma membrane. This process could modulate the cortical actin cytoskeleton, located underneath the plasma membrane, since actin dynamics are able to promote localized membrane reorganization. In addition, activated small Rho GTPases are known for regulating actin dynamics and membrane remodeling. Therefore, the modulation of such Rho GTPase activity and of F-actin by the Gag protein during virus particle formation was considered. Here, we studied the implication of the main Rac1, Cdc42, and RhoA small GTPases, and some of their effectors, in this process. The effect of small interfering RNA (siRNA)-mediated Rho GTPases and silencing of their effectors on Gag localization, Gag membrane attachment, and virus-like particle production was analyzed by immunofluorescence coupled to confocal microscopy, membrane flotation assays, and immunoblot assays, respectively. In parallel, the effect of Gag expression on the Rac1 activation level was monitored by G-LISA, and the intracellular F-actin content in T cells was monitored by flow cytometry and fluorescence microscopy. Our results revealed the involvement of activated Rac1 and of the IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway in HIV-1 Gag membrane localization and particle release in T cells as well as a role for actin branching and polymerization, and this was solely dependent on the Gag viral protein. In conclusion, our results highlight a new role for the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway in the late steps of HIV-1 replication in CD4 T lymphocytes.

IMPORTANCE

During HIV-1 assembly, the Gag proteins are targeted and assembled at the inner leaflet of the host cell plasma membrane. Gag interacts with specific membrane phospholipids that can also modulate the regulation of cortical actin cytoskeleton dynamics. Actin dynamics can promote localized membrane reorganization and thus can be involved in facilitating Gag assembly and particle formation. Activated small Rho GTPases and effectors are regulators of actin dynamics and membrane remodeling. We thus studied the effects of the Rac1, Cdc42, and RhoA GTPases and their specific effectors on HIV-1 Gag membrane localization and viral particle release in T cells. Our results show that activated Rac1 and the IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway are involved in Gag plasma membrane localization and viral particle production. This work uncovers a role for cortical actin through the activation of Rac1 and the IRSp53/Wave2 signaling pathway in HIV-1 particle formation in CD4 T lymphocytes.

The HIV-1 replication cycle leads to the formation of new viral particles, which assemble in specific microdomains located at the plasma membrane or in some intracellular compartments, according to cell type (1–4). These particles are then released from the host cell membrane by budding or from intracellular compartments by exocytosis (5). When expressed in cells, the pr55Gag precursor is both necessary and sufficient for the assembly and production of virus-like particles (VLPs). This protein has an NH₂-terminal myristate and four major domains: matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), and p6. After translation, Gag recruits the dimeric positive-strand RNA viral genome to the cytoplasm and then assembles at the inner leaflet of the plasma membrane (6). Gag multimerizes on the viral RNA via its NC and CA domains (7) and assembles on a specific plasma membrane phospholipid, phosphatidylinositol bisphosphate [PI(4,5)P₂], via its highly basic MA domain (8). The C-terminal p6 domain and a part of the NC domain then allow the recruitment of the ESCRT complex to induce particle budding (9, 10).

The MA domain of retroviral Gag proteins binds specifically to acidic lipids located at the inner leaflet of the plasma membrane and more specifically to PI(4,5)P₂ (11–20). In cells, Gag can be

found in several types of membrane microdomains, named lipid raft domains, which are enriched in cholesterol and sphingomyelin (21–24), or tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) when they contain some membrane-organizing proteins such as CD81, CD63, and CD9, etc. (25–27). However, Gag can also be found in liquid-disordered-phase membranes (17, 28). All these plasma membrane microdomains are associated with the cortical actin network (29), and it has been shown that plasma membrane deformations require the remodeling of the cytoskeleton and the

Received 21 February 2015 Accepted 14 May 2015

Accepted manuscript posted online 27 May 2015

Citation Thomas A, Mariani-Floderer C, López-Huertas MR, Gros N, Hamard-Péron E, Favard C, Ohlmann T, Alcamí J, Muriaux D. 2015. Involvement of the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway in HIV-1 Gag particle release in CD4 T cells. *J Virol* 89:8162–8181. doi:10.1128/JVI.00469-15.

Editor: S. R. Ross

Address correspondence to Delphine Muriaux, delphine.muriaux@cpbs.cnrs.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00469-15

cooperation of signaling proteins such as Rho GTPases and effectors. Therefore, it is possible that Gag assembly and particle release require the modulation of actin cytoskeleton dynamics and membrane curvature effectors.

In fact, several studies indicate a role for the actin network in the HIV-1 assembly process. First, actin is found inside HIV-1 virions, which can contain up to a 15% equimolar level of actin in comparison to Gag (30). Other related actin-binding proteins (like cofilin, Moesin, or Ezrin) are also actively or passively incorporated into the particles (31). Moreover, it was shown previously by immunoprecipitation and fractionation that actin interacts with the NC domain of Gag (32, 33), and another study suggested that actin-enriched structures could be localized underneath viral assembly sites (34). However, these results are discussed in the scientific community, because in another cell type, it was recently observed by live-cell imaging microscopy that F-actin seems not to be recruited at the HIV Gag assembly site (35). Nonetheless, the actin cytoskeleton might play an important role in virus assembly and production, since its drug-mediated inhibition changes the intracellular localization of Gag and diminishes virus production in T cells (36–38). In addition, small interfering RNA (siRNA) depletion of Filamin A, a host cell protein that regulates actin network dynamics, impairs viral particle assembly and release (39). Other cell effectors that regulate actin turnover, such as LIMK1 and ROCK1, were recently described to play a role in retrovirus release (40). Altogether, these results tend to show, directly or indirectly, a role for the regulation of the cortical actin cytoskeleton during HIV assembly and/or release, especially in CD4 T cells. This effect has also been described for the related retrovirus equine infectious anemia virus (EIAV), for which a role for actin in virus release has been reported (41, 42). It has been proposed that polymerization of actin-enriched structures at HIV-1 assembly sites could also promote cell polarization, virological synapse formation, and HIV-1 cell-to-cell transmission (36, 43). The influence of the Env glycoprotein on this mechanism is important (36, 43), but other viral proteins could also be involved. For example, the Nef regulatory viral protein acts on actin cytoskeleton remodeling and the Pak2-cofilin signaling pathway (44, 45) to inhibit infected-T-cell migration and promote cortical actin polymerization (46).

The cortical actin cytoskeleton is composed of a network of connected actin filaments, which are polymerized and depolymerized very quickly depending on the cellular context. In T cells, actin dynamics can be initiated by the signaling phospholipid PI(4,5)P₂ through the activation of Rho GTPase-mediated pathways (47–49). During HIV-1 assembly, Gag also interacts specifically with PI(4,5)P₂ at the cell plasma membrane and thus could modulate Rho GTPase-mediated actin reorganization signaling pathways. In mammals, the Rho GTPases comprise a family of at least 20 members, including the main Rac1, Cdc42, and RhoA GTPases. Most of these proteins switch between an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form. The cycling between these two states is regulated by three sets of proteins, guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs), and guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs). Activated Rho GTPases interact with downstream effector proteins, thereby stimulating a variety of cell signaling pathways (50). The RhoA-Dia1, Rac1-Pak1 (or Pak2), and Rac1-IRSp53-Wave2 pathways have been reported to be involved in the regulation of actin cytoskeleton and membrane dynamics in T lymphocytes

(51–54). Interestingly, it has also been reported that inhibition of Rac1, Cdc42, and RhoA GTPases is able to diminish virus production, while the ability of Gag to oligomerize remains unaffected (55, 56). Thus, at least one of these Rho GTPases and its signaling pathway seem to be required for HIV-1 release. However, the specific signaling pathway involved in the late phases of HIV replication remains to be identified.

In the present study, we first investigated which one of the three main Rho GTPases, Rac1, Cdc42, or RhoA, was involved in the regulation of viral particle production (50). For this purpose, we used siRNA knockdown (KD) to deplete the endogenous Rho GTPases of interest in CD4 T cells. The phenotype of virus-like particle production was analyzed by immunoblotting, and Gag intracellular localization was analyzed by immunofluorescence coupled to confocal microscopy. Our results show the importance of the Rac1-derived signaling pathway in Gag membrane attachment and VLP release. Second, we focused on the Rac1 effectors regulating actin cytoskeleton dynamics that could have an impact on Gag VLP release. With this aim, a siRNA screen against selected Rac1 effectors was performed, and the impact on VLP production was evaluated in the context of the expression of Gag/Gag-Pol, HIV-1ΔEnv (Env-deleted HIV-1), and Gag alone. We targeted the Pak2, IRSp53, Wave2, and Arp3 proteins because they are Rac1 downstream effectors that are able to modulate actin cytoskeleton and membrane remodeling. Pak2 is also known to be activated by HIV-1 Nef and consequently to interfere with actin reorganization and T-cell migration (44, 45, 57). Wave2 can activate the Arp2/3 complex through IRSp53 (53, 58), an adaptor protein that also binds Rac1 and Wave2, inducing actin branching and lamellipodium formation (58, 59). IRSp53 is also known to contain an I-BAR domain, which is able to induce membrane curvature (58). Interestingly, it has been reported that the Rac1-IRSp53-Wave2 signaling complex has an effect on HIV entry: it is activated by HIV-1 Env to promote membrane fusion and HIV-1 entry into host cells (60). Here, we studied the roles of these effectors in HIV-1 Gag assembly and VLP release, in the absence of any viral Env proteins, to focus on the late steps of HIV replication. We found that Rac1 is activated upon Gag expression and that the IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway is involved in HIV-1 Gag VLP production in a Jurkat T-cell line and primary blood lymphocytes (PBLs), along with an increase in the intracellular F-actin content. To our knowledge, this is the first time that the Wave2 complex, which promotes F-actin polymerization, is reported to be involved in the late steps of the HIV-1 replication cycle in T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Jurkat T cells (human T-cell leukemia cell line) were grown in RPMI 1640 plus Glutamax (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin-streptomycin). PBLs were purified from the blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Montpellier, with Institutional Review Board [IRB] approval for the use of anonymized samples) on Ficoll gradients. PBLs were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (1 μg/ml; Sigma) and interleukin 2 (IL-2) (150 U/ml; AIDS Reagents and Reference Program, NIH) for 48 h prior to transfection.

DNA plasmids. The plasmid expressing HIV-1 Gag alone (pCMVGag [named pGag]), the plasmid expressing HIV-1 Gag, Gag-Pol, and accessory proteins except Vpu (pCMVΔ8.2 [named p8.2]), and the plasmid expressing Env-deleted HIV-1 (named pNL4.3ΔEnv) were described previously (see references 61 and 62, respectively). Plasmids pCMV-LacZ and

pCMV-GFP were used as control plasmids and were derived from a pCMV tag plasmid (Stratagene, Agilent Technologies, Madrid, Spain) that expresses green fluorescent protein (GFP) or LacZ under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter.

DNA transfection, small interfering RNA knockdown, and cell viability. Jurkat T cells (2×10^6) were microporated with 5 μ g of p8.2 or pNL4.3 Δ Env or 4 μ g of pGag, pCMV-LacZ, or pCMV-GFP (as control plasmids), together with 150 pmol Stealth RNA interference (RNAi) siRNA against Rho GTPases (Invitrogen); 360 pmol Stealth RNAi siRNA against the Rho GTPase effector Wave2, Vav1, Dia1, or Pak2 (Invitrogen); or 250 pmol siRNA against IRSp53 or Arp3 (Santa Cruz) or the corresponding siRNA controls. The Neon transfection system, the Microporator MP-100 (Invitrogen), and the Amaxa system (Lonza) were used. After microporation, T cells were plated in RPMI complete medium, washed 24 h later with $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS), and harvested at 48 h posttransfection. Under each condition, the percent cell viability was measured with a BD FACSCalibur flow cytometer and by trypan blue cell counting. The efficiency of cell transfection was calculated by fluorescence microscopy: the number of “green” fluorescent Gag-labeled cells divided by the total number of cells was determined by using the ImageJ Analyzed Particles plug-in. The siRNA transfection efficiency was evaluated as the percentage of protein depletion relative to the siRNA control (adjusted to the tubulin loading control) by immunoblot quantification analysis using ImageJ software.

PBLs (3×10^6) were microporated with 15 μ g of pCMV Δ 8.2 or 15 μ g of pNL4.3 Δ Env, together with 450 pmol Stealth RNAi siRNA against Rac1 (Invitrogen), 1,080 pmol Stealth RNAi siRNA against Wave2 (Invitrogen), 750 pmol siRNA against IRSp53 or Arp3 (Santa Cruz Biotechnologies), or the corresponding amount of siRNA controls from Invitrogen or Santa Cruz Biotechnologies. The Amaxa system (Lonza) was used for cell microporation. PBLs were then plated in RPMI complete medium. Eight hours later, they were washed once in $1 \times$ PBS and replated in RPMI complete medium. Finally, PBLs were harvested 48 h after transfection. Under each condition, the percent cell viability was measured with a BD FACSCalibur flow cytometer and/or by trypan blue cell counting.

Antibodies. Immunoblottings were performed by using the following antibodies: anti-MAP17 and anti-CAP24 (NIH AIDS Reagent Program); HIV-1 p17 (VU47) rabbit and HIV-1 p24Gag monoclonal (24-4) mouse antisera, mouse anti-RhoA (ARH03), mouse anti-Rac1 (ARC03), and mouse anti-Cdc42 (ACD03) antisera (Cytoskeleton); rabbit anti-Wave2 (D2C8), goat anti-IRSp53 (W-20), goat anti-Dia1 (C-20), and mouse anti-Arp3 (51) (Santa-Cruz); rabbit anti-Pak2 (2608) (Cell Signaling); mouse anti-Vav1 (39-2050) (Invitrogen); mouse anti-Lamp2 (human lysosome-associated membrane protein 2) (H4B4) (Santa Cruz Biotechnologies); anti-mouse and anti-rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP) (Dako); and anti- β -tubulin antibody coupled to HRP (ab21058) (Abcam).

For immunofluorescence staining, mouse anti-CAP24 (24-4) and rabbit anti-MAP17 (VU47) (NIH), mouse anti-PI(4,5)P₂ (2C11) (Abcam) (63), and fluorescent Alexa 488- or 546-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) were used.

Viral particle purification and immunoblotting. To monitor viral particle production, culture medium containing virus-like particles was harvested at 48 h posttransfection. After filtration (0.45- μ m pore size), the viral supernatant was purified by ultracentrifugation through a sucrose cushion, i.e., 25% (wt/vol) in TNE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), at 35,000 rpm for 1 h 30 min in a Beckman SW60Ti rotor. The pellet was resuspended overnight at 4°C in TNE buffer and stored at -80°C . To analyze the intracellular viral protein content, cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.2 mM EDTA) and sonicated. The cell lysate was then clarified for 10 min at 13,000 rpm, and the protein concentration in the cell lysate was determined by the Bradford assay (64). For Western blot analysis, proteins from the viral pellet or the cell lysate (50 μ g of total proteins) or from

membrane flotation assay fractions (20 μ l) were loaded and separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride transfer membrane (Thermo Fischer), and immunoblotting was performed by using the corresponding antibodies. Finally, HRP signals were revealed by using the SuperSignal West Pico substrate (Thermo Scientific).

Transfection efficiency and VLP release calculation. The efficiency of plasmid transfection in T cells was evaluated by measuring the percentage of fluorescent cells by immunofluorescence or flow cytometry analysis. For the G-LISA, the pCMV-GFP plasmid was cotransfected with the plasmid encoding Gag, and prior to the G-LISA, the percentage of GFP-positive (GFP⁺) cells under each condition was monitored by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis in order to determine the efficacy of microporation. This value was used to normalize the results of the G-LISA as a function of the transfection efficiency.

For VLP release, the HRP signals from immunoblot membranes were imaged by using the G:Box system (Syngene), and the viral Gag or CAP24 protein signals were quantified by using ImageJ software. The percentage of VLP release (48 h after T-cell microporation with plasmids and siRNA) relative to the tubulin loading sample was then estimated as $(V_{sv} - V_{blanc}) / [(V_{sv} - V_{blanc}) / (V_{ec} - V_{blanc})] \times 100$, where V_{sv} is the viral supernatant, taking into account the quantification of the blot signals for pr55Gag and CAP24; V_{ec} is the quantification of blot signals for pr55Gag, p49, p41, and CAP24 found in the cell extract; and V_{blanc} is the background of the immunoblot membrane. Tubulin served as a loading control.

Membrane flotation assay. Jurkat T cells were transfected (microporated) with the pGag or p8.2 plasmid together with the corresponding siRNA by using Lonza Nucleopator kit V. After 24 h, cells were washed with $1 \times$ PBS, transferred to fresh RPMI medium, and then collected at 48 h posttransfection. For membrane flotation assays, cells were washed with $1 \times$ PBS and resuspended in cold $1 \times$ TE (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA) with a Complete protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were disrupted by sonication with 2 pulses for 25 s in a Bioruptor instrument at 4°C. The cell lysates were then centrifuged at $370 \times g$ for 3 min at 4°C to pellet the nuclei and unlysed cells. The resulting postnuclear supernatant (PNS) was adjusted to 150 mM NaCl, loaded under a discontinuous 10 to 75% sucrose gradient made in TNE buffer, and centrifuged to equilibrium in a Beckmann SW60Ti rotor overnight at $125,000 \times g$ at 4°C (as described in reference 15). After ultracentrifugation, fractions were collected from the top to the bottom of the density gradient. Equal volumes of samples from each fraction were loaded onto an SDS-PAGE gel and immunoblotted as described above.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging and analysis. Immunofluorescence experiments were performed on Jurkat T cells. Briefly, cells were transfected with pGag or p8.2, together with the corresponding siRNA (see above). Twenty-four hours later, cells were then seeded onto polylysine-coated coverslips and fixed in 3% paraformaldehyde (PFA)-PBS for 15 min. The fixative was then removed, and free aldehydes were quenched with 50 mM NH₄Cl. Cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min, blocked in 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS, and incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. The cells were then washed 3 times with 1% BSA-PBS and further incubated for 1 h with the corresponding secondary fluorescent antibodies. The slides were mounted with Fluoromount (Sigma). Images were acquired on an Axioplan 2 Zeiss LSM510 (at PLATIM ENS Lyon) or LSM780 (at MRI CNRS Montpellier) confocal microscope with 488/458-nm argon and 543-nm HeNe lasers and a Plan Achromat 63 \times 1.4-numerical-aperture oil objective lens, supplied with LSM510 or LSM780 software.

In order to assess the difference between the “punctate” and the “diffuse” patterns of the Gag signal, confocal laser scanning microscopy (CLSM) images (Fig. 1F to I) were analyzed by using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). In order to segment the images, simple normalized threshold processing was used. These images were then converted

to binary images, followed by watershed processing, allowing a better separation of poorly distinguishable peak and valley intensities. All the obtained segmented dots were classified by their measured areas and quantified (Fig. 1F to I).

Measurement of intracellular PI(4,5)P₂ levels. Measurement of intracellular PI(4,5)P₂ levels was performed by immunofluorescence coupled to confocal microscopy analysis. Briefly, Jurkat T cells were transfected with p8.2 or the pCMV-LacZ, or the pCMV-Pleckstrin homology (PH) domain of phospholipase C delta fused to GFP (pPH-PLCd-GFP), washed once 48 h later with 1× PBS, and immobilized on polylysine-coated coverslips. All subsequent stages were performed in a cold room. Cells were washed with PBS-CaMg buffer (1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) and fixed in 4% PFA–Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) for 3 h at 4°C. The fixative was then removed, and free aldehydes were quenched with 50 mM NH₄Cl for 15 min at 4°C. Jurkat T cells were blocked in REV buffer (1 mM MgCl₂, 0.2% saponin, 50 mM glycine, 0.1% BSA, 1% fetal bovine serum, 1× PBS) for 20 min and incubated with primary antibodies for 16 h at 4°C. The cells were then washed once with REV buffer for 45 min and further incubated with the corresponding secondary fluorescent antibodies for 2 h. After another wash in REV buffer for 45 min, the slides were mounted with Fluoromount (Sigma). Images were acquired on an Axioplan 2 Zeiss LSM510 confocal microscope with 488/458-nm argon and 543-nm HeNe lasers and a Plan Apochromat 63× 1.4-numerical-aperture oil objective lens, supplied with LSM510 software. The fluorescence intensity of the total intracellular PI(4,5)P₂ signal was quantified for each cell ($n = 20$ cells) by image analysis (ImageJ) and divided by the cell area.

Rac1 and Rho inhibitor assay. Jurkat T cells (1×10^6) were microporated with 5 μg of pCMVΔ8.2 and treated 24 h later with different concentrations of the Rac1-specific inhibitor NSC23766 (65) or the Rho inhibitor CT04, which targets ROCK. After 10 h of Rac1 inhibitor treatment or CT04 treatment, cell supernatants containing virus-like particles were harvested, and virus production under each condition was analyzed by a reverse transcription assay. Cell lysates in RIPA buffer were analyzed for Gag content by immunoblot analysis. The percent cell viability under each condition was also measured by trypan blue cell counting.

Reverse transcription assay. Ten microliters of the supernatant containing virus-like particles was added to 50 μl of a reverse transcription mix {60 mM Tris (pH 8.0), 180 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.6 mM EGTA (pH 8.0), 0.12% Triton X-100, 6 mM dithiothreitol, 6 μg/ml oligo(dT), 12 μg/ml poly(rA), and 20 μCi/ml [α -³²P]dNTP (specific activity, 3,000 Ci/mmol)}. After 1 h of incubation at 37°C, 5 μl was loaded onto DEAE paper (DE-81; Whatman) and then rinsed with 2× SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate [pH 5]). The radioactivity (X rays) of the sample was recorded by using a storage phosphorscreen (Molecular Dynamics), measured with a phosphorimager (Fuji), and quantified by using MultiGauge software (Fuji).

Rac1 and RhoA GTPase activation assay. Jurkat cells (10^7) were microporated with pCMV-LacZ (control), pGag, or pCMVΔ8.2, together with the pCMV-GFP vector, by using the Neon transfection system and the MP-100 microporator (Invitrogen). Cells were resuspended in RPMI complete medium, and 10 h later, the microporation efficiency was estimated by measuring the percentage of cells expressing GFP by flow cytometry (Becton Dickinson).

Rac1 and RhoA GTPase activation was measured by using a G-LISA Biochem Rac1 activation assay kit and a G-LISA Biochem RhoA activation

assay kit (Cytoskeleton), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were serum starved for 2 h, washed with cold 1× PBS, and lysed in 250 μl of lysis buffer containing protease inhibitors. The same amount of protein was used under each condition. Extracts were incubated in the Rac1 or RhoA affinity plate for 30 min at 4°C with agitation at 400 rpm. After washing and incubation with the antigen-presenting buffer at room temperature, the primary and secondary antibodies were incubated for 45 min at room temperature with agitation at 400 rpm. The luminescence signal representing Rac1 or RhoA GTPase activation was measured in a luminescence reader after 3 min of incubation with horseradish peroxidase detection reagent. Relative light units (RLUs) from RhoA and Rac1 GTPase activation, obtained from Jurkat cells microporated with the pGag or pCMVΔ8.2 vector, were normalized by considering the efficiency factor for each microporation.

F-actin cell content measurement. F-actin measurement was performed by flow cytometry and immunofluorescence coupled to confocal microscopy image analysis, as previously described (66). The levels of polymerized actin were measured in 10⁶ microporated cells (see above), in the absence of any stimuli. Briefly, T cells were microporated with pCMV-LacZ (control), pGag, or p8.2, together with the pCMV-GFP plasmid. The cells were then simultaneously fixed, permeabilized, and stained by incubation for 15 min at 37°C with a mixture containing 2% PFA, 0.1% Triton X-100, and phalloidin-Alexa 546 (2 U/ml) (Invitrogen). The percentage of cells expressing F-actin was measured by flow cytometry and was corrected with the transfection efficiency factor, regarding GFP expression for each microporation (T cells were microporated with pGag or p8.2 and the pCMV-GFP control vector expressing GFP).

Analysis by fluorescence microscopy coupled to confocal microscopy was performed on Jurkat T cells that were transfected with pGag, p8.2, or pCMV-LacZ; washed once 24 or 48 h later with 1× PBS; fixed with 3% PFA; and immobilized on polylysine-coated coverslips. The immunofluorescence protocol is similar to the one described above. HIV-1 Gag was revealed by anti-MAP17 or anti-CAP24 antibodies (NIH) and Alexa 488-labeled secondary antibodies. F-actin was revealed by staining with phalloidin-Alexa 546 (2 U/ml) (Invitrogen). Images of samples were acquired on a Zeiss LSM780 confocal microscope with a 63×/1.4-numerical-aperture oil differential interference contrast (DIC) Plan-Apo objective lens. The total cell F-actin/phalloidin-Alexa 546 fluorescence intensity was measured in whole cells by performing a z-projection of the cell z-stack, normalized to the cell area, by using ImageJ Z project plug-in software. The results are averages of data from 15 to 20 cells under each condition (see Fig. 9G).

Gag and F-actin localization determined by confocal microscopy and cell size measurement. The cells were prepared and imaged as described above, and for evaluating F-actin and Gag localization at the cell periphery, we performed sectioning through the cell center; the corresponding plot profile of fluorescence intensities is shown (see Fig. 8A). From the cell sections, performed on 9 to 21 cells under each condition, the maximum Gag intensity signal and its distance from the cell edge (as determined by the actin signal) were determined (see Fig. 8B). For cell size measurements, the confocal section at the z-cell center was used to measure the cell diameter by using the ImageJ "measure and label" plug-in on the F-actin images, and the average cell diameter was determined ($n = 60$ to 100 cells) (the P value was measured with the Student test, with a bilateral distribution of heteroscedastic samples) (see Fig. 8C).

values and standard deviations resulting from three independent experiments. (F to J) Effect of Rac1, RhoA, and Cdc42 depletion on Gag intracellular localization. Jurkat T cells were transfected with p8.2 and with the siRNA control (F), siRNA against Rac1 (G), siRNA against RhoA (H), or siRNA against Cdc42 (I). Cells were fixed at 48 h posttransfection, permeabilized, stained for HIV-1 Gag, and analyzed by confocal microscopy. (J) Percentage of cells with each phenotype, calculated for 50 cells. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. (K and L) Effect of Rac1 or RhoA depletion on Gag cell membrane attachment. Jurkat T cells were microporated with p8.2 and with the siRNA control or siRNA against Rac1 or against RhoA. Cells were then lysed, and the PNS was used for membrane flotation assays. Intracellular proteins of each gradient fraction were loaded onto an SDS-PAGE gel. (K) The viral Gag and Lamp2 proteins were then revealed by immunoblotting, as indicated. (L) Rac1 and RhoA depletion by siRNA knockdown, in the PNS, shown by anti-Rac1 and anti-RhoA immunoblots, respectively.

RESULTS

Rac1 knockdown modulates HIV-1 Gag VLP release and Gag intracellular localization and membrane attachment in Jurkat T cells. A previous study has shown that drug inhibition of Rho GTPases is able to reduce HIV-1 production (55). Thus, our initial goal was to determine which one of the three main Rho GTPases, Rac1, Cdc42, or RhoA, was required for virus production and release. It is known that some Rac1 and RhoA signaling pathways are activated by the viral envelope glycoprotein during the early phases of infection (56, 67, 68). Therefore, to restrict our study and focus on the late steps of the viral cycle, only HIV-1 Gag, Gag-Pol, and the accessory proteins (Tat, Rev, Nef, Vpr, and Vif) were expressed by plasmid DNA transfection in Jurkat T lymphocytes. Using these cells, we studied the effect of siRNA depletion of Rac1, Cdc42, and RhoA proteins on VLP production and Gag intracellular localization.

VLP production was monitored by ultracentrifugation of the clarified cell supernatant followed by antiviral immunoblotting and was normalized to the amount of intracellular Gag produced (Fig. 1A and B). We first checked the siRNA treatment efficiency and its effect on cell viability (Fig. 1C and D). We show that individual Rho GTPase siRNA treatment of Jurkat T cells was able to decrease endogenous Rac1 by 70%, RhoA by 80 to 90%, and Cdc42 by 90% (Fig. 1A and D). The cell transfection efficiency was evaluated to be 60 to 65% regarding the number of Gag(+) cells over total cells by immunofluorescence (Fig. 1E to I). In addition, Rho GTPase silencing did not induce strong cell mortality after microporation (average of 80 to 85% living-cell recovery) (Fig. 1C). Second, we studied the effect of Rho GTPase depletion on VLP assembly and release (as explained in Materials and Methods) (Fig. 1B), and for each condition, we checked Gag localization by immunofluorescence microscopy (Fig. 1F to I). For each image, the distributions of the object areas for each Gag signal pattern (i.e., “punctate” versus “diffuse”) under each condition were compared by using ImageJ (Fig. 1F to I): it can clearly be seen that the punctate pattern of Gag exhibits a larger amount of small objects than does the diffuse phenotype, under each of the conditions, justifying the existence of two different phenotypes (Fig. 1F to I). These two different phenotypes were then quantified for several cells under each condition (Fig. 1J).

The depletion of endogenous Rac1 by siRNA decreased virus production by 50%, as shown by immunoblotting (Fig. 1A and B), for a 70% Rac1 knockdown (KD) efficiency (Fig. 1A and D). In this case, we observed that the intracellular Gag localization was modified (Fig. 1G). Indeed, while the wild-type Gag phenotype was punctate in 96% of the cells in the presence of the siRNA control (Fig. 1F), we observed that the Gag phenotype became diffuse in 75% of the cells when Rac1 was depleted (Fig. 1G) and in 42% and 27% of the cells in the cases of RhoA and Cdc42 KDs, respectively. The depletion of endogenous RhoA by siRNA, with an 85% gene KD (Fig. 1D) and 80% cell viability (Fig. 1C), diminished virus production by only ~20% (Fig. 1A and B). In this case, Gag localization was slightly modified in comparison to that of the control (Fig. 1B) but remained punctate in 58% of the cells (Fig. 1H and J). Similarly, the depletion of Cdc42 by siRNA, with a 90% gene KD (Fig. 1D) and 70% cell viability (Fig. 1C), did not significantly change VLP release (Fig. 1A) and intracellular Gag localization (Fig. 1I and J), suggesting that Cdc42 was not involved in VLP release in these cells.

This first result suggested that the absence of Rac1 could impair Gag trafficking, membrane localization, or membrane attachment. In order to check this hypothesis, we performed a membrane flotation assay on Jurkat T cells microporated with p8.2 and the siRNA control or siRNA against Rac1 or RhoA (Fig. 1K). In this case, we first checked, by anti-Rac1 or anti-RhoA immunoblotting, that Rac1 or RhoA was depleted (Fig. 1L). Second, with the siRNA control, we were able to detect Gag in the membrane fractions (Fig. 1K, p8.2 + siRNA Control, lanes 2 and 3). However, when Rac1 was depleted, all Gag proteins were detected in the cytoplasmic fractions (Fig. 1K, p8.2 + siRNA Rac1, lanes 7 and 8), while the Lamp2 membrane protein was located in the upper gradient fraction (as shown by Lamp2 immunoblotting) (Fig. 1K, p8.2 + siRNA Rac1, lane 2). As a control, we performed the same experiment with the siRNA against RhoA, and we observed that under these conditions, RhoA was depleted (Fig. 1L), and Gag was found in the cytosol (Fig. 1K, lanes 7 and 8) and in the gradient membrane fraction (fractions 2 and 3), in which the membrane protein Lamp2 was detected (Fig. 1K, p8.2 + siRNA RhoA). These results indicated a role for Rac1 in Gag membrane attachment, compared to RhoA. Note that in the membrane flotation assay performed on Jurkat T cells expressing Gag, it was difficult to detect a strong signal for Gag in the membrane fraction of the PNS gradient, certainly due to the fact that it was difficult to collect enough membrane in T cells, compared to other cell lines, or it was due to the limit of detection of this assay.

Our results show that Rac1 plays a role in regulating VLP production and Gag membrane localization in Jurkat T lymphocytes, while RhoA and Cdc42 seem less involved or dispensable.

A Rac1-specific inhibitor is able to decrease VLP release. To confirm the role of Rac1, we assayed the effects of two drugs targeting Rho GTPases on VLP production in Jurkat T cells (Fig. 2). The specific Rac1 inhibitor NSC23766 was able to decrease VLP production in a dose-dependent manner (Fig. 2A), while CT04, a Rho inhibitor targeting ROCK, was not (Fig. 2C), under conditions which preserved cell viability (Fig. 2B and D). In only one experiment was the cell viability decreased to 65% at the highest NSC23766 concentration (i.e., 200 μ M); otherwise, the cell viability was 80%, as measured by trypan blue exclusion. In addition, at 50 and 100 μ M NSC23766, the decrease in VLP release correlated to a 2.5- \pm 0.6-fold increase in the intracellular Gag content (data not shown). Thus, under these conditions, the decrease in VLP release is dependent on a specific drug effect (Fig. 2A). In contrast, with CT04 treatment, we did not observe any decrease in VLP release (Fig. 2C), no increase in intracellular Gag content was observed, and, if anything, there was a slight decrease (0.7- \pm 0.2-fold compared to the control without drug) (data not shown). These results confirm that Rac1 plays an important role in VLP production in Jurkat T lymphocytes, contrary to Rho GTPases regulated by ROCK.

An intact Rac1-Wave2-IRSp53-Arp2/3 pathway is required for optimal virus production. Based on the data presented above, it appears that a Rac1-derived signaling pathway is required for virus assembly and release in CD4 T lymphocytes. However, Rac1 regulates many signaling pathways in T cells. Indeed, on one hand, Rac1 can activate the phosphatidylinositol 4-phosphate-5-kinase, which induces PI(4,5)P₂ synthesis (69, 70). On the other hand, Rac1 can also regulate actin cytoskeleton dynamics (49, 50) through several signaling pathways, such as Rac1-Pak2-cofilin or Rac1-IRSp53-Wave2-Arp3 (Fig. 3A). Therefore, using a siRNA

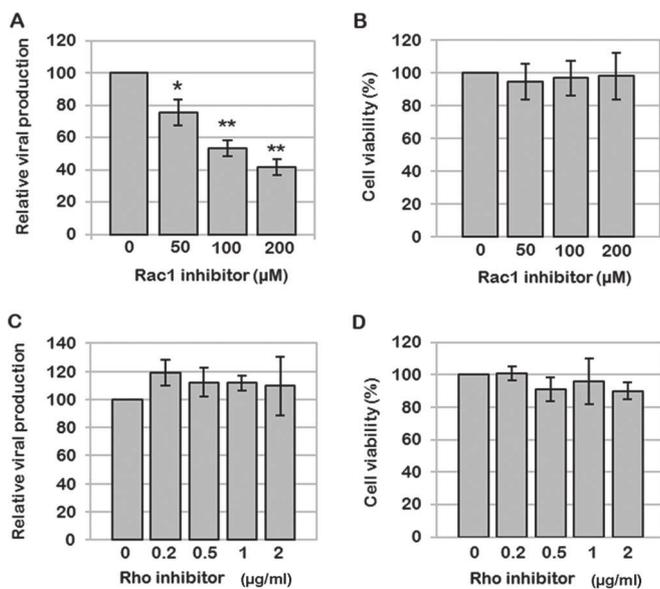


FIG 2 Effects of the Rac1 inhibitor NSC23766 and the Rho inhibitor CT04 on VLP production. Jurkat T cells were transfected with p8.2 and treated 24 h later with different concentrations of a Rac1-specific inhibitor or the Rho inhibitor CT04. (A and B) Effect of the Rac1-specific inhibitor NSC23766 on VLP production. (A) After 10 h of treatment, virus production was analyzed by a reverse transcription assay. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. The statistical significances of differences were calculated by an unpaired *t* test. **, *P* value of <0.01; *, *P* value of <0.05. (B) Cell viability measured by using trypan blue. (C and D) Effect of the Rho inhibitor CT04 on VLP production. (C) After drug treatment, virus production was analyzed by a reverse transcription assay. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. (D) Cell viability measured by using trypan blue.

approach, we analyzed which of these effectors might be required for VLP assembly and release in T cells.

First, we analyzed whether the impact of Rac1 on virus production was related to its regulating role in PI(4,5)P₂ synthesis. Indeed, during HIV-1 assembly, the MA domain of Gag binds specifically to the acidic phospholipids, especially PI(4,5)P₂, located at the inner leaflet of the cell plasma membrane, thus targeting Gag to the plasma membrane for assembly into VLPs. It is therefore possible that Rac1 silencing might induce a decrease in the intracellular PI(4,5)P₂ level and consequently a decrease in Gag membrane binding and virus production. To check this hypothesis, we performed an analysis of the intracellular localization and level of PI(4,5)P₂ in Rac1-depleted cells by immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 3B and C). We checked that the PI(4,5)P₂ antibody was able to recognize the Jurkat T-cell plasma membrane and to colocalize with a GFP-tagged PH domain of phospholipase C, which is known to specifically recognize PI(4,5)P₂-enriched membrane domains (Fig. 3B). We then analyzed the ratio of the PI(4,5)P₂ fluorescence intensity signal to the cell area in T cells expressing Gag, or not, in the presence of Rac1 siRNA or the siRNA control (Fig. 3C). Despite efficient Rac1 silencing (Fig. 3D), no deleterious effect on the localization of PI(4,5)P₂ at the plasma membrane (Fig. 3B) or on its intracellular level (Fig. 3C) was observed, while VLP production was decreased (Fig. 3D). This result suggested that the effect of Rac1 on Gag membrane localization and VLP release seemed not to be primarily related to its role in the regulation of PI(4,5)P₂ synthesis. This

may be explained by the fact that PI(4,5)P₂ was present in large amounts at the cell plasma membrane.

As it has been reported in several studies that the actin cytoskeleton might have a role in HIV-1 assembly and release (26, 38, 39), particularly in T cells, we next analyzed whether Rac1 was modulating VLP release via the downstream effectors Pak2, IRSp53, Wave2, and Arp2/3, which have a role in cortical actin dynamics (Fig. 3A). Indeed, Pak2 regulates actin filament turnover, while the IRSp53-Wave2 complex activates the Arp2/3 proteins and consequently actin filament branching in lamellipodia (49, 59). Moreover, these proteins are known to be involved in the regulation of HIV-1 replication. Pak2 is activated by HIV-1 Nef to interfere with T-cell migration (44, 45, 57). With this aim, silencing of these Rac1 effectors was performed, and the impact on cell viability and virus production was evaluated in Jurkat T cells and primary T cells (PBLs) (see Fig. 5 and 6). As it was reported previously that the Rac1-Wave2-IRSp53 signaling complex is activated by HIV-1 Env to promote membrane fusion and HIV-1 entry into cells (60), the role of Rac1 effectors in VLP release in the absence of HIV-1 Env was studied to focus on the late steps of the viral replication cycle.

As a control, we checked that siRNA microporation in Jurkat T cells and PBLs did not affect VLP production (Fig. 4). Indeed, when Jurkat T cells (Fig. 4A and B) or PBLs (Fig. 4C and D) were microporated with a plasmid expressing either p8.2 or Gag without any siRNA, after 48 h, the cells were able to produce mature and immature VLPs, respectively (Fig. 4A and C). The same experiment was performed by microporation of Jurkat T cells, or PBLs, with p8.2, or pGag, in the presence of the control siRNA: it was observed that the presence of the siRNA slightly increased the intracellular Gag content but also VLP release (Fig. 4A and C). However, the calculations of VLP release (Fig. 4B and D) showed no difference in VLP release from Jurkat T cells, or PBLs, microporated with or without siRNA. Second, to check that Jurkat T cells, upon microporation with pGag and siRNA, were indeed producing VLPs and not cellular debris containing Gag resulting from the experimental microporation procedure, we monitored Gag VLP release versus MACA release (Fig. 4F). MACA is a Gag protein that is deleted of its C-terminal NC-p1-p6 region and deleterious in VLP release. Under our conditions, i.e., microporated Jurkat T cells with plasmids and siRNA, we could not detect any MACA VLP released in the cell supernatant in the presence of either Rac1 siRNA or control siRNA, as shown by anti-CA immunoblotting (Fig. 4F), compared to Gag VLPs. This was for 60% of cells expressing MACA-mEOS2 (a monomeric variant of green-to-red photoswitchable fluorescent protein) and 80% cell viability, as measured by FACS analysis (data not shown), while the protein was well expressed in cells, as seen by green fluorescence microscopy (Fig. 4E).

In addition to the above-mentioned Rac1 effectors, the role of a RhoA effector, Dia1, in VLP production in Jurkat T cells (Fig. 5A and D) and in PBLs (Fig. 5E and H) was analyzed. Dia1 is an effector of RhoA that activates the nucleation and elongation of actin filaments (71). As RhoA had only a minor impact on virus production (Fig. 1A and 2C), Dia1 silencing by siRNA should not alter Gag VLP production in T cells, as shown in Fig. 5 and 6. Indeed, in Jurkat T cells expressing Gag, in the presence of Gag-Pol and accessory proteins (i.e., p8.2), siRNA depletion of Dia1 did not significantly modify VLP production (Fig. 5A and B), whereas cell viability was preserved (Fig. 5C). Similarly, Pak2 si-

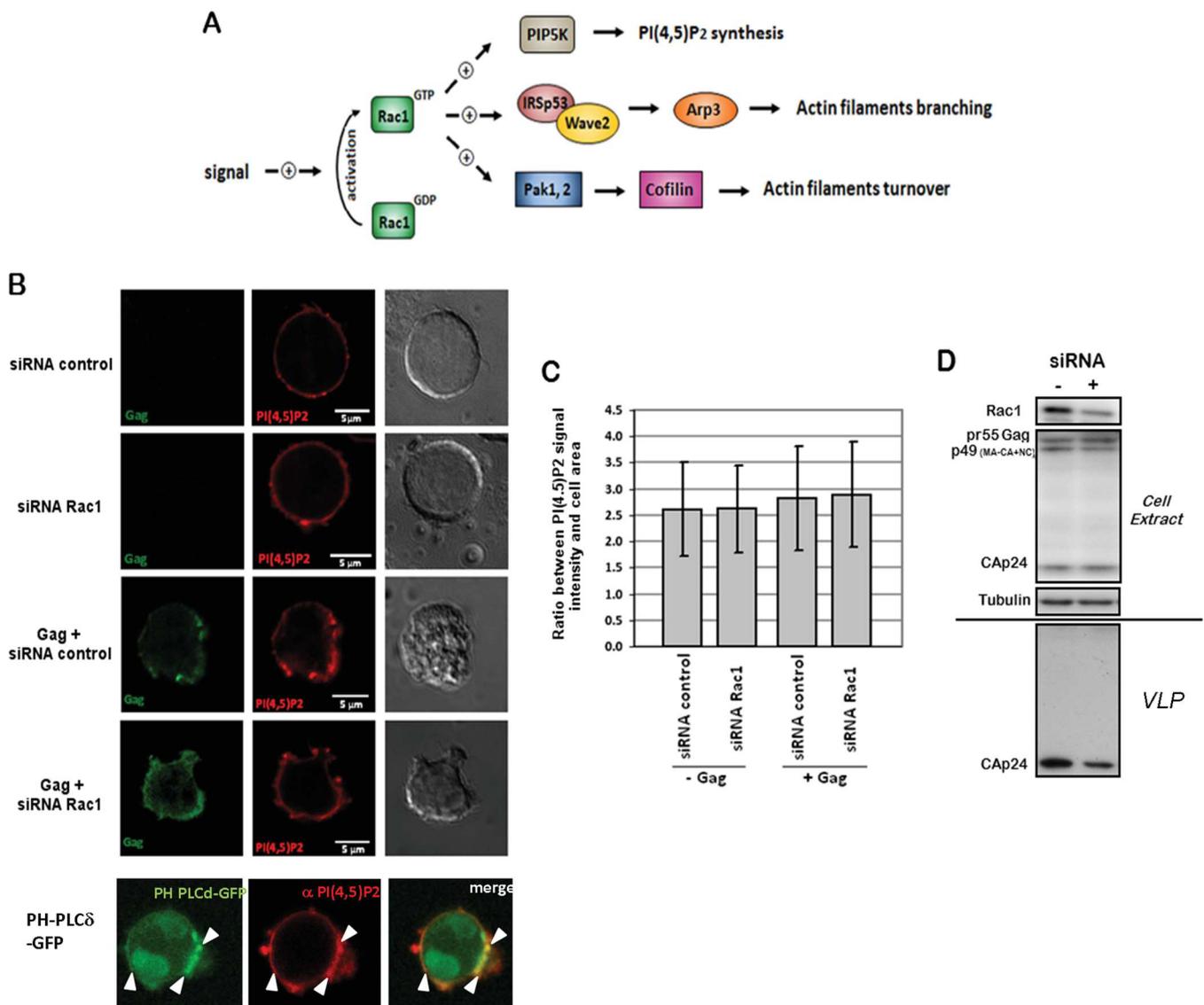


FIG 3 Effect of siRNA-mediated depletion of Rac1 on intracellular PI(4,5)P₂ levels in Jurkat T cells. (A) Rac1-dependent cell signaling pathways having an effect on actin filament dynamics. In T cells, Rac1 GTPase plays an important role in the regulation of actin cytoskeleton rearrangement. Indeed, on one hand, in response to extracellular signals, Rac1 is activated and could stimulate actin filament turnover by the intermediate of the Pak1 (or Pak2)-LIMK-cofilin pathway. On the other hand, activated Rac1 could also stimulate actin filament branching in lamellipodia. In the latter case, IRSp53 is recruited by Rac1 and binds the proline-rich region of Wave2. As a result, Wave2 is activated and induces actin branching via Arp2/3 complex recruitment. In a third case, Rac1-GTP could also activate the phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K), which catalyzes the synthesis of PI(4,5)P₂ at the cell plasma membrane. (B to D) Effect of siRNA-mediated depletion of Rac1 on intracellular PI(4,5)P₂ levels. (B) Cells were transfected with pCMV-LacZ, p8.2 (Gag, Gag-Pol, and viral accessory proteins), or PH-phospholipase C delta (PLC δ)-GFP, together with the siRNA control or siRNA against Rac1, as indicated. At 48 h posttransfection, cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-MAp17 and anti-PI(4,5)P₂ antibodies. The colocalization of the GFP-tagged PH domain of phospholipase C delta and the PI(4,5)P₂ antibody is indicated as a control for PI(4,5)P₂-enriched membrane domains (white arrows). (C) The ratio of the PI(4,5)P₂ signal intensity to the cell area was measured by image analysis (ImageJ) ($n = 20$ cells). (D) Immunoblot analysis of Rac1 GTPase and HIV-1 Gag in cell lysates and/or in virus particles. Tubulin was used as a loading control.

lencing had no effect (Fig. 5D). On the contrary, siRNA depletion of IRSp53, Wave2, and Arp3 decreased virus production by $55\% \pm 2\%$, $50\% \pm 10\%$, and $25\% \pm 6\%$, respectively (Fig. 5A and B), in Jurkat T cells, under conditions where cell viability was preserved (Fig. 5C), with a KD efficiency of 60 to 70% (Fig. 5D). The same experiment was performed on PBLs (Fig. 5E to H) purified from uninfected patient blood cells and activated with PHA/IL-2. Similarly to what was observed for Jurkat T cells, siRNA depletion of Wave2, IRSp53, and Arp3 in PBLs microporated with p8.2 was

able to decrease VLP production by $50\% \pm 8\%$, $60\% \pm 12\%$, and $50\% \pm 10\%$, respectively (Fig. 5E and F), while cell viability was maintained for 60 to 75% of the cells (Fig. 5G), for a KD efficiency of 65 to 80% (Fig. 5H). These results demonstrated for the first time the involvement of Rac1, IRSp53, Wave2, and Arp3 in HIV-1 particle production in primary T lymphocytes.

We then studied the role of Rac1 and its effectors in the context of an HIV-1 provirus depleted of the Env gene to focus on the late steps of virus replication and to prevent the activation of the Rac1

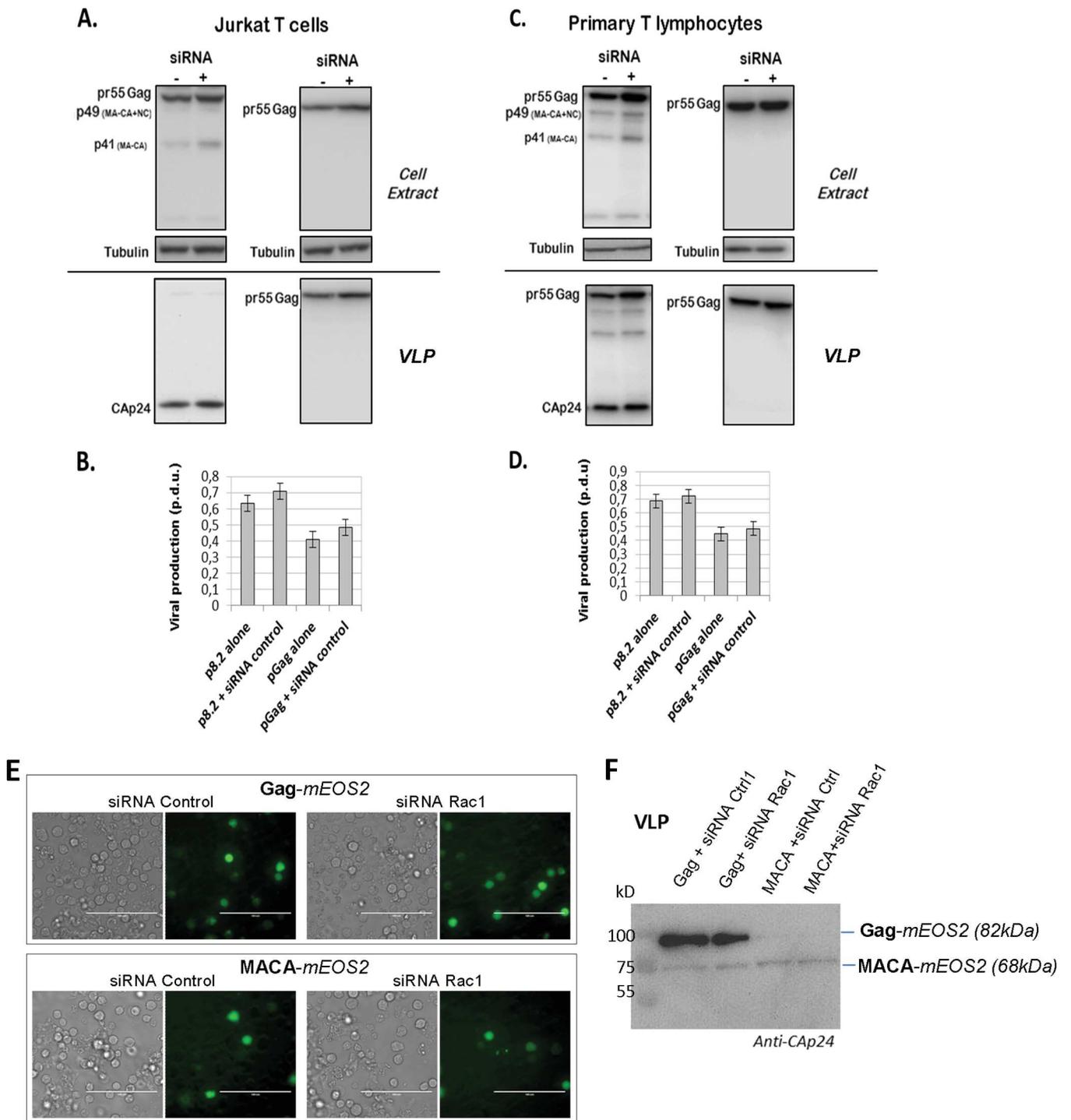
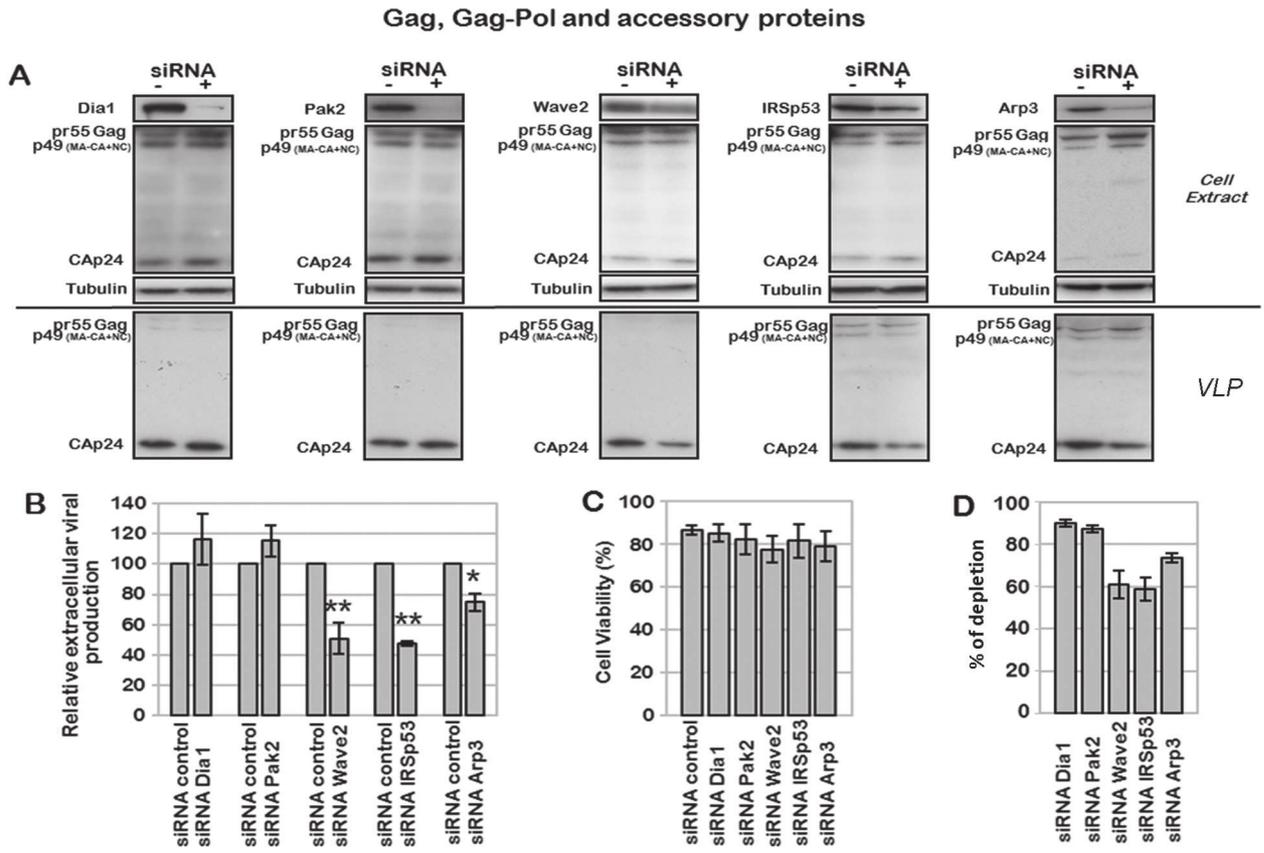
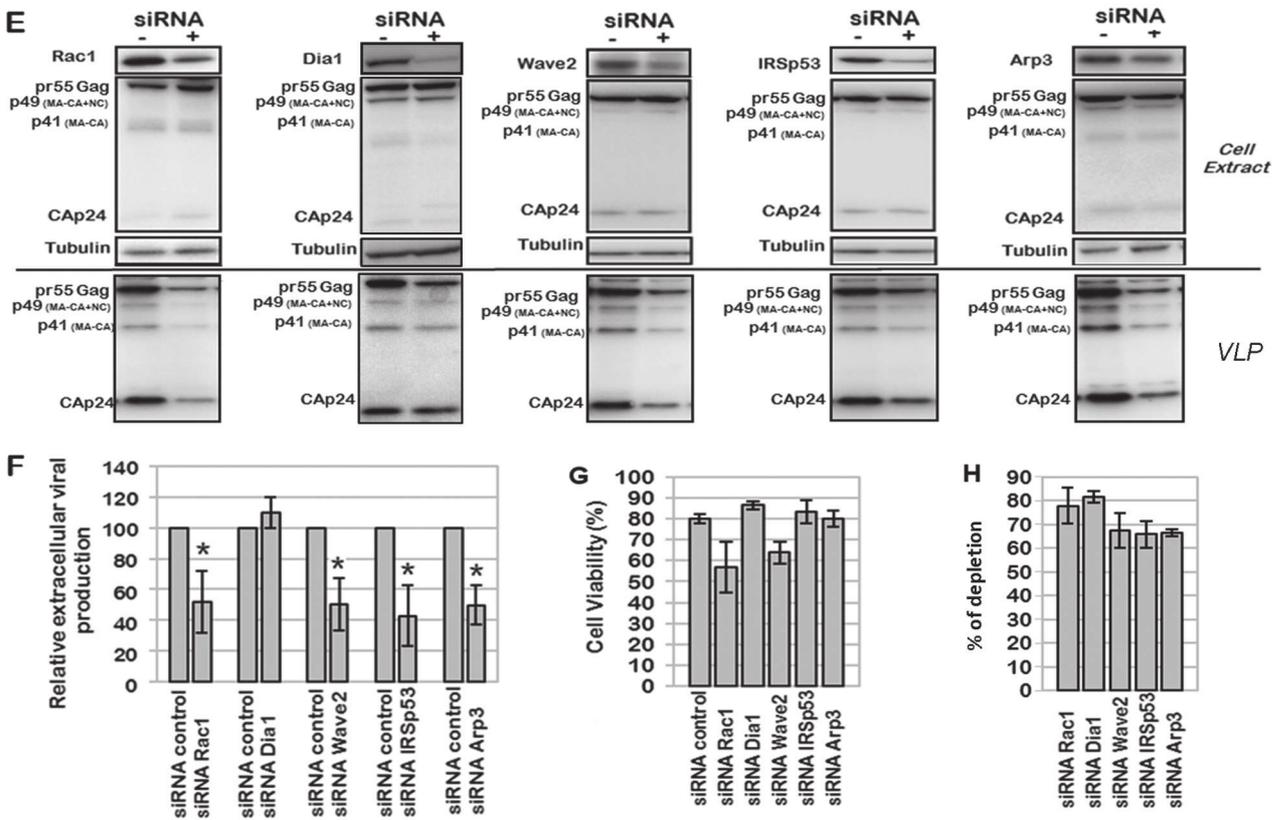


FIG 4 Effect of siRNA microporation on production of mature and immature VLPs. Jurkat T cells or PBLs were microporated with p8.2 or pGag without any siRNA (–) or with control siRNA (+). (A and C) Immunoblot analysis of pr55Gag and CAp24 in cell lysates and in VLPs of Jurkat T cells (A) or primary T lymphocytes (C). Tubulin was using as a loading control. (B and D) Extracellular VLP production was measured by quantification of immunoblot images, corresponding to the ratio of extracellular pr55Gag or CAp24 to intracellular pr55Gag. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. p.d.u., protein detectable unit. (E and F) Control analysis of Gag and MACA VLP production. (E) Visualization of Jurkat T cells expressing mEOS2-tagged Gag or MACA with the corresponding siRNA by fluorescence and transmission microscopy (bar = 100 μ m). (F) Immunoblots (anti-CAp24) of VLPs of Jurkat T cells expressing mEOS2-tagged Gag (82 kDa) or mEOS2-tagged MACA (68 kDa) together with the siRNA control or siRNA against Rac1, at 48 h postmicroporation.

Jurkat T cells



Primary T lymphocytes



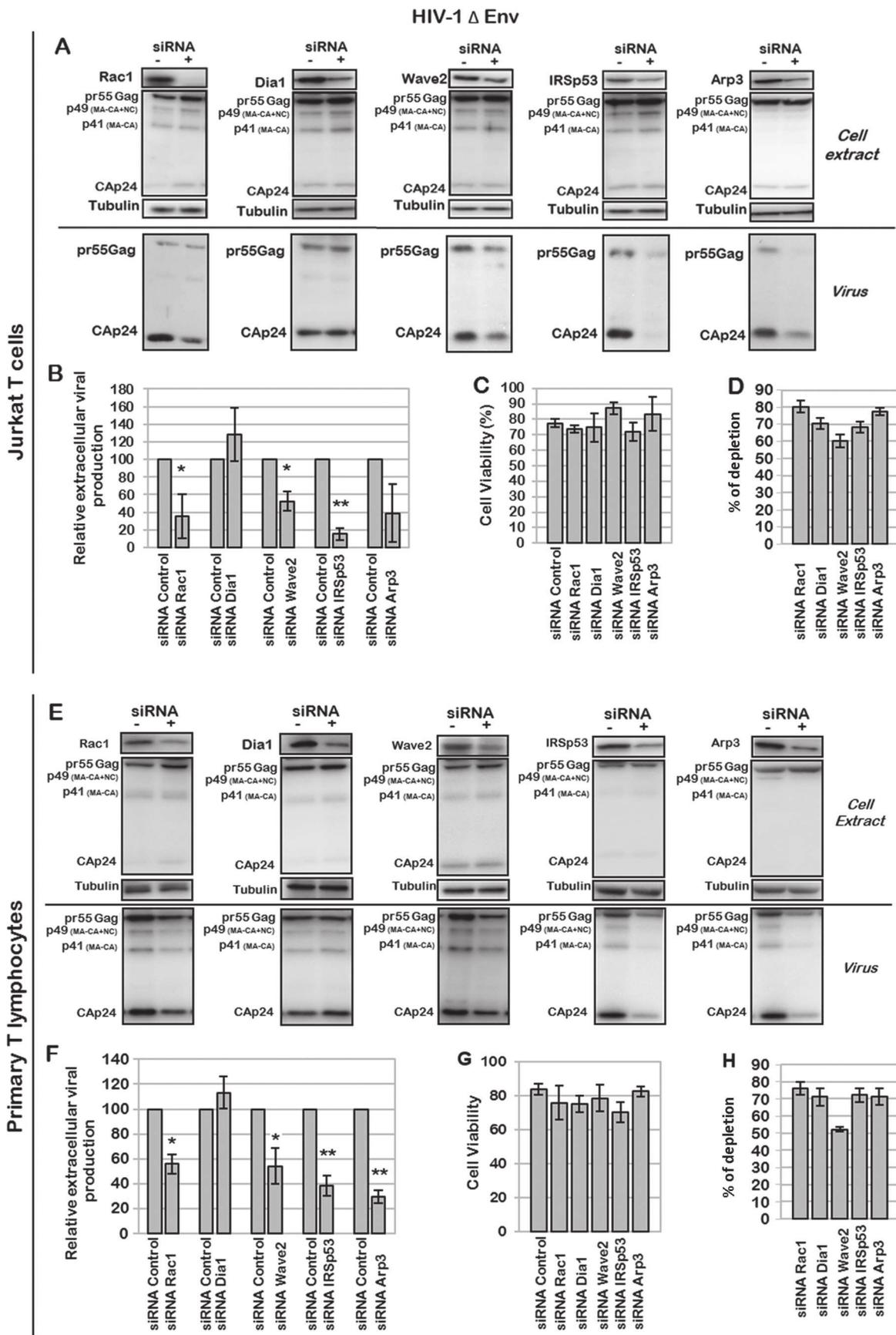
signaling pathway during virus entry. These experiments were conducted with HIV-1 Δ Env-expressing Jurkat T cells (Fig. 6A to D) and PBLs (Fig. 6E to H). While the Dia1 siRNA control had no significant effect on HIV-1 Δ Env production, as expected, the KDs of Rac1, Wave2, IRSp53, and Arp3 decreased HIV-1 Δ Env particle production by $38\% \pm 20\%$, $48\% \pm 13\%$, $85\% \pm 7\%$, and $62\% \pm 30\%$, respectively, in Jurkat T cells (Fig. 6A and B) and by $45\% \pm 7\%$, $46\% \pm 14\%$, $62\% \pm 8\%$, and $70\% \pm 5\%$, respectively, in PBLs (Fig. 6E and F). Under these conditions, cell viability was preserved for at least 85% of the cells (Fig. 6C and G), and the KD gene efficiency varied from 50 to 80% (Fig. 6D and H). It is worth noting that IRSp53 gene silencing by siRNA had more of an effect on VLP release (up to a 5-fold reduction in virus particle production, for 70% protein depletion) than did silencing of other genes, underlining the involvement of this cellular protein (Fig. 6A and B). Importantly, the same results were observed with PBLs (Fig. 6E and F). Overall, these data show the involvement of the cellular proteins Rac1, Wave2, IRSp53, and Arp3 in optimal VLP release, independently of the Env protein, in both a T-cell line and primary blood lymphocytes.

The involvement of the Rac1-Wave2-IRSp53-Arp3 pathway in VLP production is dependent on Gag. The literature has reported an effect of the HIV-1 Tat and Nef accessory proteins on several Rac1-derived signaling pathways (44, 45, 66). We thus decided to study if the effect of the Rac1-Wave2-IRSp53-Arp3 signaling pathway on virus production observed here was mediated by HIV-1 accessory proteins or solely by the Gag viral protein. For this purpose, we performed siRNA screening targeting Rac1 effectors on Jurkat T cells expressing immature HIV-1 Gag and producing VLPs (Fig. 7). As shown in Fig. 7A, the depletion of Rac1, Wave2, IRSp53, and Arp3 by siRNA decreased Gag VLP production by $50\% \pm 7\%$, $45\% \pm 12\%$, $55\% \pm 4\%$, and $34\% \pm 2\%$, respectively (Fig. 7B), while Pak2 depletion had no effect. Under these conditions, cell viability was preserved (Fig. 7C), and the KD efficiency was up to 80% (Fig. 7D). Altogether, these results suggested that the effect of the Rac1-Wave2-IRSp53-Arp2/3 signaling pathway on viral particle production was mediated mainly by the Gag viral protein. It was interesting to notice that, as observed with the HIV-1 provirus, the most pronounced effects on Gag VLP release were observed with IRSp53 and Wave2 siRNA treatments, even if these cellular proteins were not completely depleted, strongly suggesting that these two proteins might be important cofactors for HIV-1 Gag particle release. For the first time, here, we describe a role for two cellular proteins, IRSp53 and Wave2, that are cofactors of cell membrane curvature and cortical actin dynamics in HIV-1 Gag particle release, due solely to the presence of Gag in T cells.

Double Wave2 and IRSp53 knockdowns, although partial,

modulate intracellular Gag localization and strongly decrease VLP production. In order to check if IRSp53 and Wave2 acted in synergy in the same signaling pathway, the effect of the double knockdown of these two proteins was tested following treatment of Gag-expressing Jurkat T cells with a double-siRNA mix against Wave2 and IRSp53 proteins. Gag localization, compared to F-actin, as well as cell sizes were analyzed by confocal microscopy imaging (Fig. 8A to C). Gag VLP release and cellular protein depletion were monitored by immunoblotting (Fig. 8D). We found that the transfection efficiency of the HIV-1 pGag plasmid in Jurkat T cells was $72\% \pm 7\%$ (for a total number of cells of $140 \leq n \leq 187$), as analyzed by Gag immunofluorescence (Gag-positive “green” fluorescent cells over nonfluorescent cells). Strikingly, we observed that the double-knockdown T cells could be identified by cell size measurements (Fig. 8C). We then found that $55\% \pm 9\%$ of total cells were transfected with siRNA and that $48\% \pm 3\%$ of total cells were transfected with both pGag and siRNA. Indeed, the Wave2 or IRSp53 siRNA-treated cells presented a defect in their cellular F-actin phenotype: instead of being regularly located underneath the cell plasma membrane, cortical F-actin staining became irregular, in patches in the cytosol (Fig. 8A), and a slight increase in cell size was observed, i.e., $\sim 9 \mu\text{m}$ in diameter (IRSp53 or Wave2 siRNA), instead of $\sim 7 \mu\text{m}$ on average for the siRNA control cells (Fig. 8C). For the double siRNA (IRSp53 and Wave2), the cells exhibited a cellular volume that increased significantly (Fig. 8A), i.e., $\sim 12 \mu\text{m}$ in diameter, instead of $\sim 7 \mu\text{m}$ on average for the siRNA control cells (Fig. 8C). The double-knockdown cells were easily identified by their loss of F-actin shape (more diffuse in the cytosol) (Fig. 8A), in comparison to wild-type Jurkat T cells, in which the F-actin formed a uniform, well-defined ring underneath the cell plasma membrane (Fig. 8A). In addition, it is worth noting that the partial depletion of the IRSp53 and Wave2 siRNA (Fig. 8A, panel a) seemed to prevent Gag localization to the cell plasma membrane, as Gag appeared highly localized in the cytosol compared to its localization in siRNA control cells (Fig. 8A, panel d). Several images of double-knockdown (IRSp53 and Wave2 siRNA) cells expressing Gag showed a loss of Gag membrane labeling and mainly a cytosolic Gag localization (Fig. 8Aa to c), in comparison to the control (Fig. 8Ad). As shown in Fig. 8B, we were able to quantify the distance between the maximum intensity of the intracellular Gag fluorescent signal and the cell border (determined by the F-actin fluorescent signal): one can observe that this distance (for an average of 9 to 11 cells) was ~ 833 nm when Gag was expressed in the double-KD (IRSp53 and Wave2) cells and was ~ 145 to 172 nm in Wave2 or IRSp53 single-KD cells, compared to the control wild-type cells (Fig. 8B). These results suggested that in the double-KD cells, Gag was un-

FIG 5 Effect of Rac1-dependent cell signaling and the Wave2 multicomplex on virus assembly and mature VLP production. (A to D) Effect of Dia1, Pak2, Wave2, IRSp53, and Arp3 depletion on virus assembly and mature particle production. Jurkat T cells were transfected with p8.2 (Gag, Gag-Pol, and viral accessory proteins) and with the siRNA control or siRNA against Dia1, Pak2, Wave2, IRSp53, or Arp3. (A) Immunoblot analysis of HIV-1 pr55Gag and CAP24 in cell lysates and in virus particles. Tubulin was used as a loading control. (B) Extracellular virus production measured by quantification of immunoblot images, corresponding to the ratio of extracellular CAP24 to intracellular pr55Gag and CAP24. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. The statistical significances of differences were calculated by an unpaired *t* test. **, *P* value of <0.01 ; *, *P* value of <0.05 . (C) Cell viability measured by using trypan blue. (D) Quantification of protein depletion after siRNA treatment. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. (E to H) Effect of the Rac1-Wave2-IRSp53-Arp3 cell signaling pathway on virus assembly and mature particle production in primary T lymphocytes (PBLs). PBLs were transfected with p8.2 and with the siRNA control or siRNA against Rac1, IRSp53, Wave2, or Arp3. (E) Immunoblot analysis of HIV-1 pr55Gag and CAP24 in cell lysates and in virus particles. Tubulin was used as a loading control. (F) Extracellular virus production measured as described above for panel C. Bars show mean values and standard deviations resulting from two independent experiments. (G) Cell viability measured by using trypan blue. (H) Quantification of protein depletion after siRNA treatment.



able to reach or attach to the cell plasma membrane. Unfortunately, we were unable to verify this observation by membrane flotation assays with Jurkat T cells expressing Gag only, as the latter was not detectable in the membrane fractions under these conditions (in contrast to p8.2 in Fig. 1K) (data not shown). However, upon the partial depletion of both IRSp53 and Wave2 ($38\% \pm 6\%$ and $44\% \pm 15\%$ protein depletion, respectively), we observed that Gag VLP release was strongly reduced (by $75\% \pm 5\%$), in comparison to the control double siRNA (Fig. 8D). Overall, these results showed that a partial double depletion of Wave2 and IRSp53 impaired Gag membrane localization, resulting in a greater decrease in Gag VLP release than with individual knock-downs. These data support a role for the Wave2 complex in intracellular Gag localization and VLP production.

Rac1 is activated upon expression of HIV-1 Gag in Jurkat T cells, and intracellular F-actin content is increased. In the literature, it has been reported that Wave2 is an essential regulator of the actin cytoskeleton through its ability to stimulate Arp2/3-dependent actin polymerization downstream of activated Rac1 (72). The regulation of Wave2 by Rac1 is complicated because it can require other signaling molecules, such as IRSp53 (58). As we observed that the depletion of these proteins mediating the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway was able to modulate HIV-1 Gag production in T cells, we thus studied whether HIV-1 Gag was able to activate Rac1 and F-actin polymerization. We focused on these parameters because Rac1 activation is the signal that initiates the signaling pathway, and F-actin polymerization is the cellular response to this signal.

First, we measured the level of endogenous Rac1 activation (Fig. 9A), or RhoA as a control (Fig. 9B), in Jurkat T cells by G-LISA (see Materials and Methods). Rac1 and RhoA GTPases are able to switch between an active GTP-bound state and an inactive GDP-bound state. The G-LISAs allowed the detection and quantification of the amount of the intracellular GTP-bound forms of Rac1 and RhoA by specific antibody detection and luminescence and thus allowed us to monitor the intracellular levels of activated Rac1 and RhoA. In Jurkat T cells expressing Gag, in the presence of Gag-Pol and accessory proteins, the activation level of Rac1 was increased by $9\text{-} \pm 1.7\text{-fold}$ (Fig. 9A), in comparison to the negative control (Fig. 9A). This effect might be due to the presence of the viral accessory proteins Tat and/or Nef, as it was reported previously that they could modulate Rac1 activity during the late steps of HIV-1 replication (66, 73, 74). Therefore, to determine the role of HIV-1 Gag alone in Rac1 activation, the same experiment was performed following pGag microporation in Jurkat T cells. In this case, Rac1 activation was increased by $4.3\text{-} \pm 1.9\text{-fold}$ relative to the control (Fig. 9A) and normalized to the amount of transfected

cells (GFP⁺ cells), as measured by flow cytometry. These results indicated that Rac1-GTP activation could be induced by the expression of only Gag in Jurkat T cells. In contrast, the effect of Gag alone on the activation level of RhoA ($1.2\text{-} \pm 0.4\text{-fold}$) was equivalent to that of the control (Fig. 9B) and thus was negligible compared to that of Rac1 activation. The level of activation of RhoA was slightly increased (by $2\text{-} \pm 1.4\text{-fold}$) when Gag and accessory proteins were expressed but not when Gag alone was expressed (Fig. 9B). These data showed that the role of RhoA in the regulation of the late steps of virus replication in Jurkat T cells seemed minor compared to that of Rac1 and was dependent on HIV-1 accessory proteins. In these cells, an activated form of Rac1 seemed to be required for efficient particle formation and release, and this activation could be mediated by Gag alone, although it was enhanced by the presence of viral accessory proteins.

Second, we studied the effect of HIV-1 Gag expression in Jurkat T cells on the intracellular F-actin content. Here, we quantified the intracellular F-actin content by flow cytometry analysis and by fluorescence microscopy. The F-actin level was measured by flow cytometry analysis of phalloidin-Alexa 546-stained Jurkat T cells expressing Gag or not (Fig. 9C and D). The expression of Gag alone and in the presence of Gag-Pol and accessory proteins resulted in significant increases of the intracellular F-actin content, by $6.3\% \pm 2\%$ and $8.4 \pm 3.3\%$, respectively (Fig. 9C). To confirm these results, we also measured the F-actin level by fluorescent phalloidin-Alexa 546 staining and semiquantitative fluorescence microscopy analysis (Fig. 9F and G). In this case, we observed an increase of the intracellular F-actin level when Gag was expressed in Jurkat T cells (Fig. 9F). We measured the F-actin fluorescence intensity in the total cell volume (as described in Materials and Methods) for cells expressing Gag labeled by phalloidin-Alexa 546, and we observed a 2- to 3-fold increase in the F-actin content in Jurkat T cells expressing Gag compared to the control (pCMV-LacZ) (Fig. 9G). These data suggested that both Gag alone and Gag with accessory proteins could activate F-actin polymerization in T cells, as suggested in previous studies (44, 45, 66). Altogether, our data showed that Gag expression in Jurkat T cells activated Rac1 and increased the intracellular F-actin content.

DISCUSSION

The aim of our study was to characterize which one of the main small Rho GTPases Rho, Rac1, and Cdc42 and which associated specific downstream effectors were involved in HIV-1 particle release in host CD4⁺ T cells. Indeed, HIV assembly could occur either at the plasma membrane of infected cells or in virus-containing compartments, depending on the cell type (2, 3, 5, 75). It has been reported that in CD4⁺ T lymphocytes, viral particles are

FIG 6 Effect of Rac1-dependent cell signaling on production of Env-deleted HIV-1 particles. (A to D) Effect of Rac1, Dia1, Wave2, IRSp53, or Arp3 depletion on production of mature particles. Jurkat T cells were transfected with pNL4.3ΔEnv and with the siRNA control or siRNA against Rac1, Dia1, Wave2, IRSp53, or Arp3. (A) Immunoblot analysis of pr55Gag and CAp24 in cell lysates and in virus particles. Tubulin was used as a loading control. (B) Extracellular virus production measured by quantification of immunoblot images, corresponding to the ratio of extracellular CAp24 to intracellular pr55Gag and CAp24. Bars show mean values and standard deviations resulting from two independent experiments. The statistical significances of differences were calculated by an unpaired *t* test. **, *P* value of <0.01; *, *P* value of <0.05. (C) Cell viability measured by using trypan blue. (D) Quantification of protein depletion after siRNA treatment by using ImageJ software, relative to the tubulin loading control. Bars show mean values and standard deviations resulting from three independent experiments. (E to H) Effect of Rac1, Dia1, Wave2, IRSp53, or Arp3 depletion on production of mature particles in PBLs. PBLs were transfected with pNL4.3ΔEnv and with the siRNA control or siRNA against Rac1, Dia1, Wave2, IRSp53, or Arp3. (E) Immunoblot analysis of HIV-1 pr55Gag and CAp24 in cell lysates and in virus particles. Tubulin was used as a loading control. (F) Extracellular virus production calculated as described above for panel B. Bars show mean values and standard deviations resulting from two independent experiments. (G) Cell viability measured by dead cell counting using trypan blue. (H) Quantification of protein depletion after siRNA treatment.

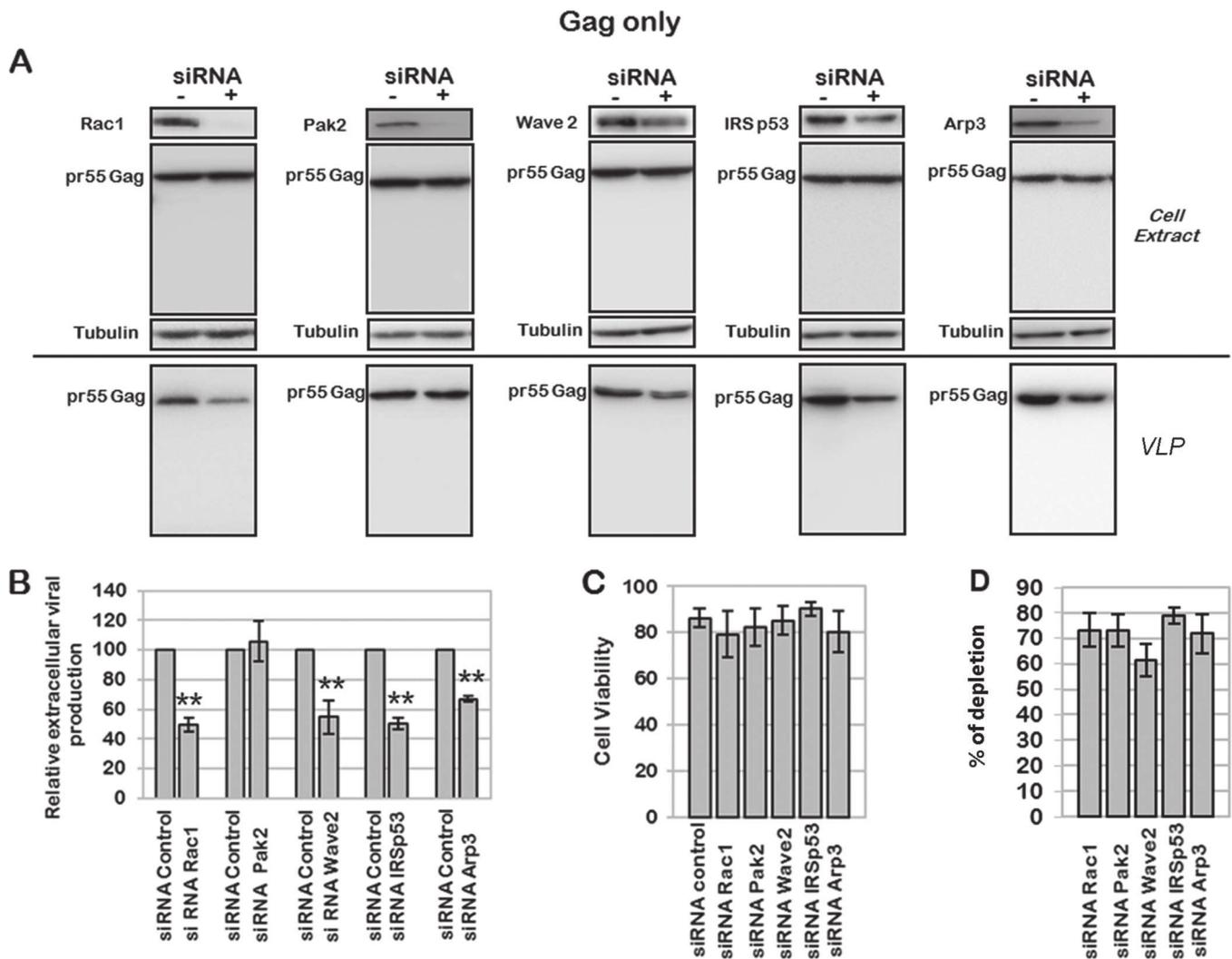


FIG 7 Effect of siRNA targeting the Wave2 multicomplex on Gag VLP production. Jurkat T cells were transfected with pGag and with the siRNA control or siRNA against Rac1, Pak2, Wave2, IRSp53, or Arp3. (A) Immunoblot analysis of pr55Gag in cell lysates and in viral particles. Tubulin was using as a loading control. (B) Extracellular virus production measured by quantification of immunoblot images, corresponding to the ratio of extracellular pr55Gag to intracellular pr55Gag. Bars show mean values and standard deviations resulting from four independent experiments. The statistical significances of differences were calculated by an unpaired *t* test. **, *P* value of <0.01. (C) Cell viability evaluated by dead cell counting using trypan blue. (D) Quantification of protein depletion after siRNA treatment. Bars show mean values and standard deviations resulting from four independent experiments.

released mainly by direct budding from the plasma membrane (76). HIV-1 particle assembly is driven by the viral Gag protein, which targets specifically the PI(4,5)P₂ phosphoinositide, located at the inner leaflet of the cell plasma membrane (18). In addition, this phosphoinositide is a critical second messenger that regulates a myriad of cellular activities, including actin remodeling and branching. In the latter case, the PI(4,5)P₂ phosphoinositides are the sites where activated Rho GTPases are recruited to initiate cell signaling pathways (47, 49). As small Rho GTPases and their effectors are key regulators of actin remodeling and membrane dynamics (77), their involvement at the HIV-1 assembly site was considered.

Several studies have shown that activated Rac1 as well as downstream signaling pathways, including the Wave2 multicomplex (78), are involved in the early steps of HIV-1 replication (56, 67, 68), such as virus entry and virus-cell fusion. However, the re-

quirement for activated Rac1 in the late steps of HIV replication had not been assessed thoroughly. It was recently reported that the hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor Arhgdib/d4gdi limited HIV-1 replication, but the GTPase involved was not identified (56). In our study, we first checked the implications of the main small Rho GTPases Rac1, RhoA, and Cdc42 in VLP release and intracellular Gag localization and membrane attachment in CD4 T cells. We then identified the downstream effectors involved in the context of Gag, Gag/Gag-Pol, or HIV-1ΔEnv VLP production. Our work was performed by using a noninfectious system devoid of the viral envelope glycoproteins in order to prevent interference with the early steps of HIV-1 infection, as a role for the Rac1-Wave2-IRSp53 pathway in HIV-1 entry was reported previously (60). Using a siRNA strategy, we clearly showed the involvement of the Rac1-Wave2-IRSp53-Arp2/3 signaling pathway in the late phases of HIV-1 replication, both in a T-cell line

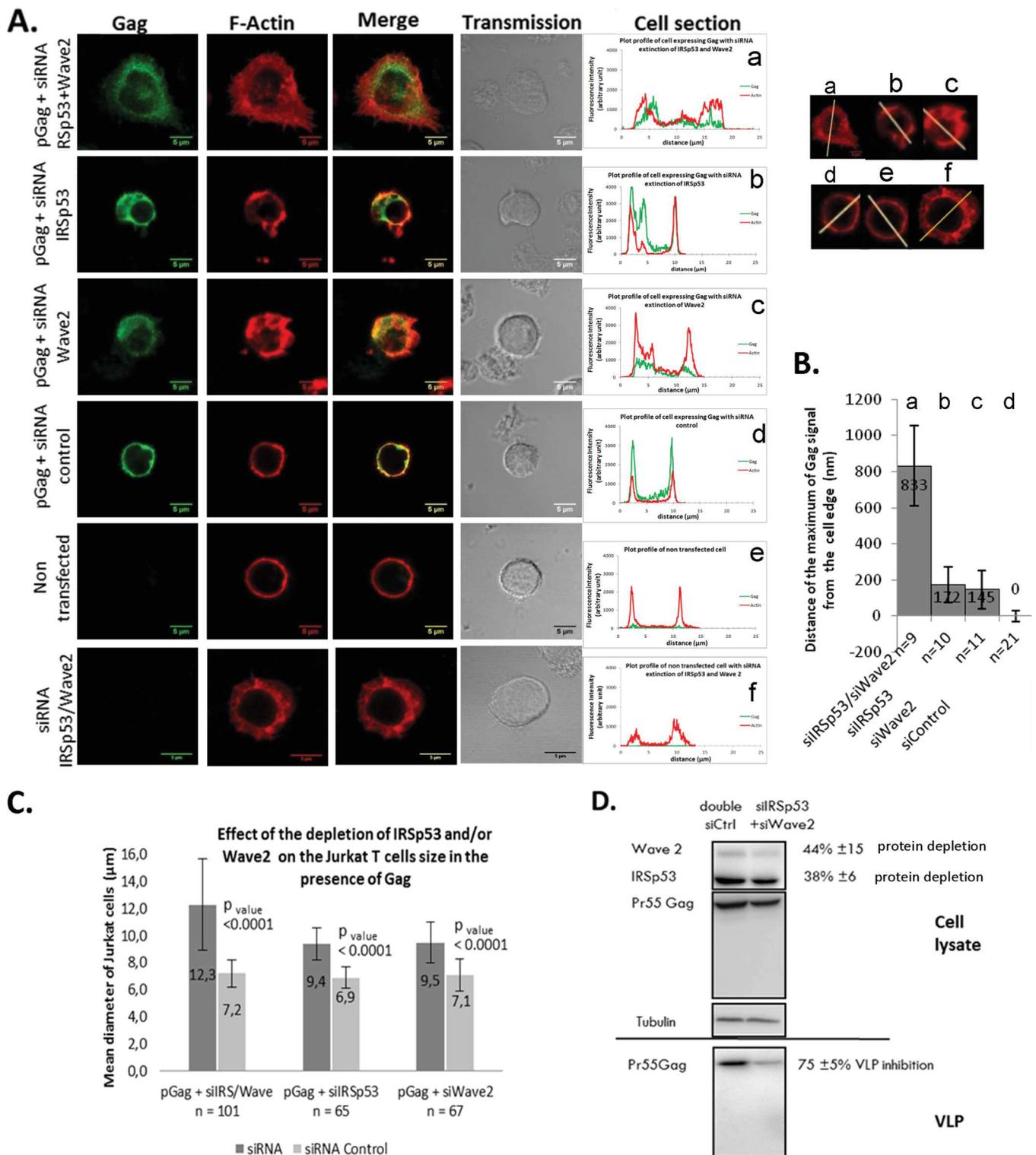


FIG 8 Effect of a partial double knockdown of IRSp53/Wave2 by siRNA on HIV-1 Gag localization and VLP release in T cells. (A) Jurkat T cells were transfected with the vector pGag (HIV-1 Gag expression) (a to d) or pCMV-LacZ (control) (e and f), together with a mix of siRNA (Wave2 and IRSp53) (a and f) or a mix of control siRNAs (d). The cells were fixed and stained for F-actin (phalloidin-Alexa 546) (red) and Gag (anti-MAP17-Alexa 488) (green). Merge and transmission images are presented. The cell sections show Gag and F-actin fluorescent signals at the cell periphery. (B) Distance of the maximum Gag fluorescent signal from the cell edge (determined by the actin signal) under each condition ($n = 9$ to 21 cells). (C) Cell mean diameters (in micrometers) of the different cell transfection conditions, as indicated. The effect of the depletion of IRSp53 and/or Wave2 on Jurkat T-cell sizes compared to those of siRNA control-treated cells, in the presence of Gag, is shown. (D) Immunoblot analysis of pr55Gag in T-cell lysates and in VLPs. On the right are the average percentages of depletion of each protein and of inhibition of VLP release from three independent experiments. Tubulin was used as a loading control.

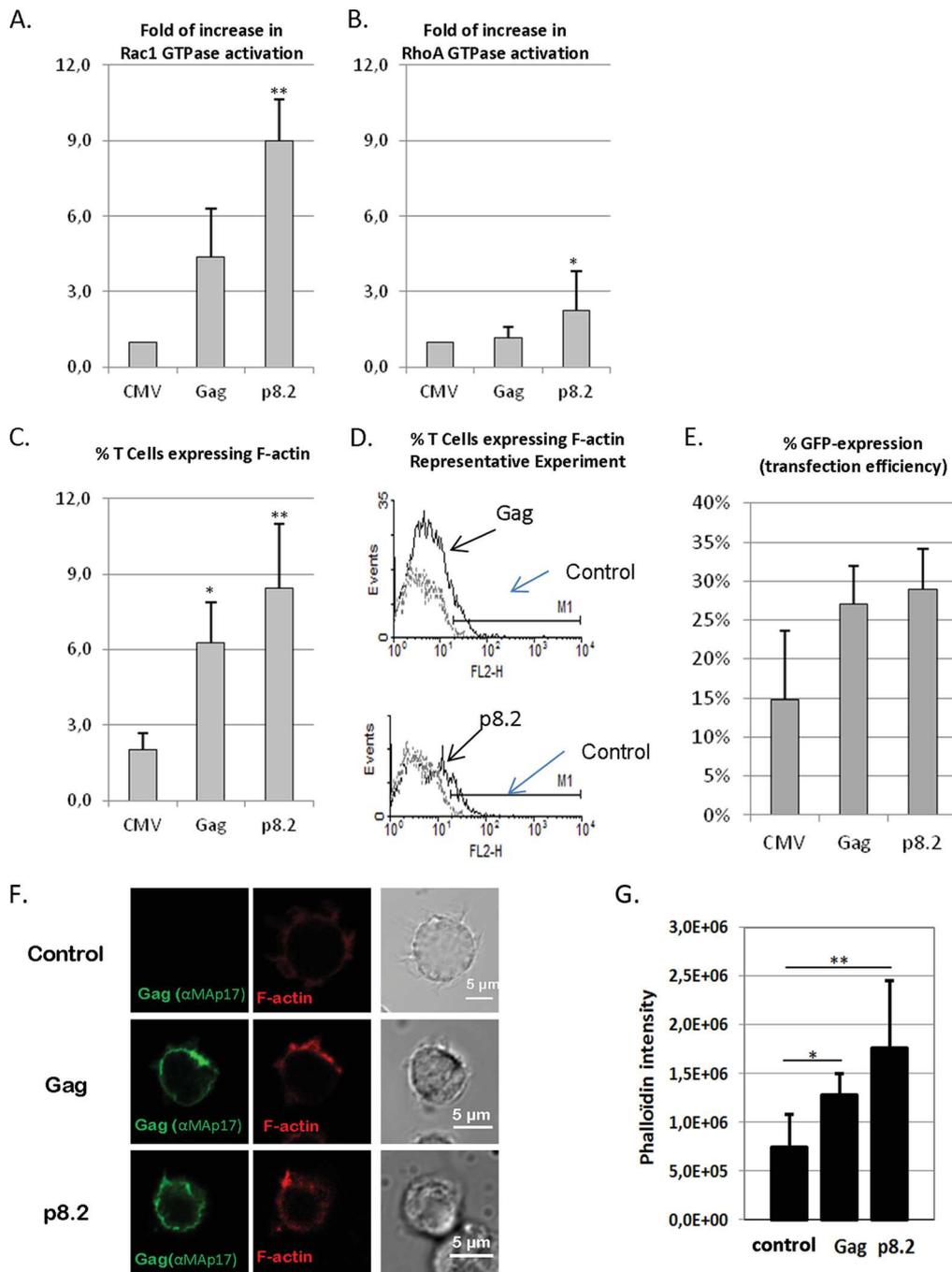


FIG 9 Effect of Gag on Rac1 and RhoA activation and on F-actin content in T cells. Jurkat T cells were microporated with a control plasmid or pGag (HIV-1 Gag expression) or p8.2 (expression of Gag, Gag-Pol, and viral accessory proteins), together with the pCMV-GFP plasmid, which was used to normalize the microporation efficiency. (A and B) Effect of Gag on Rac1 and RhoA activation. Data shown are representative of data from three independent experiments. Rac1 (A) and RhoA (B) activation was measured by G-LISA. Data shown indicate the fold increases of GTPase activation regarding activation in Jurkat T cells expressing the control plasmid. * and ** indicate *P* values of <0.05 and 0.01, respectively. (C to E) Effect of Gag on F-actin content in Jurkat T cells as determined by flow cytometry. F-actin expression was measured by flow cytometry analysis in cells simultaneously fixed and permeabilized and then stained with phalloidin-Alexa 546. (C) Median percentages of cells expressing F-actin and standard deviations, which were calculated for Gag- or p8.2-microporated T cells compared to the GFP expression levels in control cells (microporated with pCMV-GFP), from seven independent experiments. (D) Data from a representative flow cytometry experiment. The continuous line represents F-actin fluorescence in T cells microporated with pGag or p8.2, and the discontinuous line is the control (T cells microporated with pCMV-GFP). * and ** indicate *P* values of <0.05 and 0.01, respectively. (E) Transfection efficiency was monitored by the percentage of GFP expression in each experiment. Values are averages of data from seven independent experiments. (F and G) Effect of Gag on F-actin content in Jurkat T cells, as determined by immunofluorescence imaging. Cells were transfected with pCMV-LacZ (control), pGag (encoding HIV-1 Gag), or p8.2 (encoding Gag, Gag-Pol, and accessory proteins). At 24 h posttransfection, Jurkat T cells were harvested, fixed, permeabilized, and stained with anti-MAP17 antibodies and phalloidin-Alexa 546. The left panels show images from a representative experiment. (G) The phalloidin intensity in Jurkat T cells under each condition was measured by image analysis (ImageJ) (*n* = 20 cells). The histogram shows the results obtained. * and ** indicate *P* values of <0.05 and 0.01, respectively.

and in PBLs. Our results revealed an essential role of activated Rac1, and of RhoA to a lesser extent, in HIV-1 Gag VLP production in Jurkat T cells. The minor effect of RhoA could be explained by a potential role of Citron-K, an effector of RhoA, in enhancing HIV-1 production by stimulating the endosomal compartments and exocytosis, as observed previously for adherent cells (79). Here, using nonadherent Jurkat T cells and PBLs, for which it has been shown that HIV-1 buds mostly from the cell plasma membrane (5, 75), we reported a major involvement of Rac1 (Fig. 1, 5 to 7, and 9).

As activated Rac1 is known to be located at the cell plasma membrane and able to modulate several signaling pathways (Fig. 3A), our results strongly suggested the involvement of a Rac1-dependent signaling pathway in HIV-1 assembly and particle release in T cells. These pathways are involved in the regulation of actin cytoskeleton and membrane dynamics in T lymphocytes (52, 53, 58, 80), including the Vav1-Rac1-Pak1 (or Pak2)-cofilin and the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp3 pathways, which were therefore explored. Interestingly, depletion of Pak2 did not decrease Gag VLP production, i.e., in the absence of Nef (Fig. 5), while depletion of Pak1 decreased Gag VLP production by ~25% (data not shown). Vav1 is an important Rac1 activator involved in the formation of the immunological synapse by promoting F-actin nucleation and accumulation at the cell edge (80). Furthermore, during the last steps of viral replication, Vav1 can be activated by the HIV-1 accessory protein Nef (74, 81) as well as by the cellular Zap70 protein (82), which regulates cell-to-cell spread of HIV-1 (83). Thus, we tested the effect of siRNA depletion of Vav1 on virus production, and we observed a 2-fold decrease of virus production in Jurkat T cells expressing Gag, Gag-Pol, and accessory proteins (including Nef) but no decrease of Gag VLP production with Gag alone (data not shown). These results were in agreement with data from previous studies showing that Pak1 (or Pak2), Vav1, and HIV-1 Nef form a complex during the last steps of viral replication, which modulates actin dynamics and induces cytoskeleton rearrangements (57, 74, 81) and which might regulate particle production.

Here, our data showed, for the first time, that another Rac1-mediated signaling pathway, the Wave2-IRSp53-Arp2/3 multi-protein complex, is involved in HIV-1 particle release (Fig. 5 and 6). This effect was mediated mainly by HIV-1 Gag alone (Fig. 7). In addition, IRSp53/Wave2 double-siRNA treatment of T cells expressing Gag significantly increased the inhibitory effect on VLP release in comparison to single knockdowns (Fig. 8D) and induced the mislocalization of Gag in Jurkat T cells (Fig. 8A). This finding strongly supports the involvement of this pathway in virus production through the viral Gag protein. The fact that the observed siRNA effect on Gag VLP release never exceeded 4-fold might be due to the fact that the targeted proteins, i.e., IRSp53 and Wave2, are required for cell survival and cell membrane and cytoskeleton integrities and therefore cannot be further silenced without affecting cell viability. However, by adapting experimental conditions to maintain cell survival with a partial knockdown of targeted genes, it was possible to monitor significant effects on Gag membrane localization and on virus release, as shown by several control experiments (Fig. 4). Therefore, our results suggest that the Wave2 complex could be essential for HIV-1 Gag membrane localization and virus production (Fig. 8).

Furthermore, the activation of Rac1 was induced by the sole presence of Gag in Jurkat T cells (Fig. 9A). The hypothesis of a

recruitment of a Rac1-activated Wave2 multicomplex at the Gag assembly sites was therefore possible. Indeed, we were able to observe a significant modulation of the intracellular F-actin content in Jurkat T cells expressing Gag (Fig. 9C and G). These measurements were used to quantify intracellular F-actin contents in another study, and the results shown were of the same order of magnitude (66). Activation of the Wave2 complex at the cell plasma membrane requires the simultaneous presence of activated Rac1 (GTP-bound Rac1) together with PI(3,4,5)P₃ or PI(4,5)P₂ phospholipids (72), the IRSp53 protein as a linker between Rac1 and Wave2 (58), and the Arp2/3 branching factor. Thus, it is conceivable that the Wave2/IRSp53 complex and Gag may recognize these acidic phospholipids in the same membrane domains during virus assembly to promote local F-actin branching. Actually, the depletion of the Arp2/3 actin nucleator by siRNA impaired HIV-1ΔEnv and Gag VLP production (Fig. 5 to 7), and a significant increase in the level of F-actin in T cells expressing Gag was observed (Fig. 9C to G). In the literature, roles for the regulatory HIV-1 Tat protein (66) and Nef (44, 45) in F-actin cytoskeleton remodeling, during the early and the late steps of the viral cycle, respectively, have already been described. Here, we showed that, in addition to Tat and Nef, the structural Gag protein itself could have an effect on F-actin cell content (Fig. 9C, F, and G).

To our knowledge, this work reports, for the first time, the involvement of activated Rac1 and the IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway during the late steps of the HIV replication cycle concomitant with an increase in the F-actin T-cell content dependent solely on the Gag viral protein. Further investigations are needed to determine whether Gag and Wave2 interact directly or indirectly, whether they are located within the same membrane domains or not, and if Gag could trigger its recruitment to the cell plasma membrane.

In conclusion, a potential role of actin polymerization during HIV-1 particle formation in T cells can be considered, involving the activation of Rac1 and the IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway. We thus hypothesize that a temporary increase in the F-actin level at the Gag assembly site could occur to maintain Gag multimers in cell membrane domains by preventing their return to the cytosol, therefore stabilizing the multi-Gag assembling bud. An alternative hypothetical scenario could be that actin branching may favor viral budding by creating a template in the vicinity of the viral budding site, acting as a mechanical force for particle release, as suggested by previous cryo-electron microscopy (cryo-EM) studies (84). Actually, cryo-EM quantification of F-actin filaments within or in the vicinity of viral buds (for adherent cells expressing HIV-1 Gag/Gag-Pol) was recently reported, indicating that almost half of the budding sites analyzed were associated with F-actin branching in the viral bud in formation (85). This observation is in agreement with our results. A potential implication of the NC domain of Gag was proposed (32, 33), but this has recently been challenged, as that study reported no difference in virus release when the NC domain of Gag was replaced by a leucine zipper domain (85). Those same authors concluded that the NC domain of HIV-1 Gag was dispensable for actin incorporation into HIV-1 particles (85). Therefore, the domain(s) of Gag responsible for the F-actin association with viral buds remains to be identified.

Finally, several studies indicated a role for actin or related actin-binding proteins in HIV-1 assembly or release, which could be actively or passively incorporated into the particles (31), and an atomic force microscopy study suggested that large actin-enriched

structures could localize underneath virus assembly sites (34). However, a recent study failed to detect F-actin at the HIV-1 Gag assembly sites by live-cell imaging microscopy (35). Of note, F-actin was labeled through Life-actin-mCherry, with the uncertainty of the incorporation of such a molecule in filamentous actin, and this was done in adherent HeLa cells (35). Nonetheless, by using Jurkat T cells or PBLs, this study, as well as others (36–38), clearly showed that drug-mediated or siRNA-mediated inhibition of actin cytoskeleton dynamics changed the intracellular Gag membrane localization and impaired virus production. This suggests that short and dynamic F-actin oligomers can act temporally at the HIV-1 assembly sites to favor Gag membrane localization and particle release, at least in nonadherent T cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Décimo and J. L. Darlix for scientific advice and Caroline Goujon for review. We thank the PLATIM microscopy platform (ENS Lyon) and MRI (Montpellier). We are also grateful to the CNRS, INSERM, and ENS Lyon.

A.T. received fellowship support from the ANRS and FRM. We are very thankful for grant funding from SIDACTION and ANRS, France.

REFERENCES

- Corbin A, Grigorov B, Roingard P, Darlix J, Muriaux D. 2008. Revisiting HIV-1 assembly. *Med Sci (Paris)* 24:49–55. (In French.) <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/200824149>.
- Grigorov B, Arcanger F, Roingard P, Darlix J, Muriaux D. 2006. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* 359:848–862. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.017>.
- Joshi A, Ablan SD, Soheilian F, Nagashima K, Freed EO. 2009. Evidence that productive human immunodeficiency virus type 1 assembly can occur in an intracellular compartment. *J Virol* 83:5375–5387. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00109-09>.
- Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S, Schwartz O, Benaroch P. 2007. HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2:85–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.011>.
- Ono A, Freed EO. 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 78:1552–1563. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.3.1552-1563.2004>.
- Kutluay SB, Bieniasz PD. 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* 6:e1001200. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001200>.
- Muriaux D, Darlix J. 2010. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* 7:744–753. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.6.14065>.
- Ono A. 2010. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell* 102:335–350. <http://dx.doi.org/10.1042/BC20090165>.
- Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin JA, de La Cruz J, Nagashima K, Bouamr F. 2009. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXn late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog* 5:e1000339. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000339>.
- von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, Ward DM, Chung H, Morita E, Wang HE, Davis T, He G, Cimbro DM, Scott A, Kräusslich H, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114:701–713. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00714-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00714-1).
- Chen K, Bachtiar I, Piszczek G, Bouamr F, Carter C, Tjandra N. 2008. Solution NMR characterizations of oligomerization and dynamics of equine infectious anemia virus matrix protein and its interaction with PIP2. *Biochemistry* 47:1928–1937. <http://dx.doi.org/10.1021/bi701984h>.
- Chukkapalli V, Hogue IB, Boyko V, Hu W, Ono A. 2008. Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding. *J Virol* 82:2405–2417. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01614-07>.
- Chukkapalli V, Oh SJ, Ono A. 2010. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1600–1605. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908661107>.
- Hamard-Peron E, Muriaux D. 2011. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology* 8:15. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-15>.
- Hamard-Peron E, Juillard F, Saad JS, Roy C, Roingard P, Summers MF, Darlix JL, Picart C, Muriaux D. 2010. Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4,5)P2/PS and a polybasic region in the matrix. *J Virol* 84:503–515. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01134-09>.
- Inlora J, Chukkapalli V, Derse D, Ono A. 2011. Gag localization and virus-like particle release mediated by the matrix domain of human T-lymphotropic virus type 1 Gag are less dependent on phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate than those mediated by the matrix domain of HIV-1 Gag. *J Virol* 85:3802–3810. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02383-10>.
- Kerviel A, Thomas A, Chaloin L, Favard C, Muriaux D. 2013. Virus assembly and plasma membrane domains: which came first? *Virus Res* 171:332–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.014>.
- Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14889–14894. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405596101>.
- Prchal J, Srb P, Hunter E, Ruml T, Hrabal R. 2012. The structure of myristoylated Mason-Pfizer monkey virus matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in its membrane binding. *J Mol Biol* 423:427–438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.021>.
- Saad JS, Ablan SD, Ghanam RH, Kim A, Andrews K, Nagashima K, Soheilian F, Freed EO, Summers MF. 2008. Structure of the myristylated human immunodeficiency virus type 2 matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in membrane targeting. *J Mol Biol* 382:434–447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.027>.
- Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich H. 2006. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2641–2646. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511136103>.
- Dick RA, Goh SL, Feigenson GW, Vogt VM. 2012. HIV-1 Gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18761–18766. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1209408109>.
- Nguyen DH, Hildreth JE. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74:3264–3272. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.7.3264-3272.2000>.
- Ono A, Freed EO. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13925–13930. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.241320298>.
- Grigorov B, Attuil-Audenis V, Perugi F, Nedelec M, Watson S, Pique C, Darlix J, Conjeaud H, Muriaux D. 2009. A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* 6:28. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-6-28>.
- Jolly C, Sattentau QJ. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol* 81:7873–7884. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01845-06>.
- Thali M. 2011. Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem Soc Trans* 39:529–531. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0390529>.
- Keller H, Kräusslich H, Schwillle P. 2013. Multimerizable HIV Gag derivative binds to the liquid-disordered phase in model membranes. *Cell Microbiol* 15:237–247. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12064>.
- Ridley A. 2011. Life at the leading edge. *Cell* 145:1012–1022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>.
- Ott DE, Coren LV, Kane BP, Busch LK, Johnson DG, Sowder RC, II, Chertova EN, Arthur LO, Henderson LE. 1996. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 70:7734–7743.
- Ott DE, Coren LV, Johnson DG, Kane BP, Sowder RC, II, Kim YD, Fisher RJ, Zhou XZ, Lu KP, Henderson LE. 2000. Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 266:42–51. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1999.0075>.
- Liu B, Dai R, Tian CJ, Dawson L, Gorelick R, Yu XF. 1999. Interaction

- of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol* 73:2901–2908.
33. Wilk T, Gowen B, Fuller SD. 1999. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol* 73:1931–1940.
 34. Gladnikoff M, Shimoni E, Gov NS, Rousso I. 2009. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys J* 97:2419–2428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.016>.
 35. Rahman SA, Koch P, Weichsel J, Godinez WJ, Schwarz U, Rohr K, Lamb DC, Kräusslich H, Müller B. 2014. Investigating the role of F-actin in human immunodeficiency virus assembly by live-cell microscopy. *J Virol* 88:7904–7914. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00431-14>.
 36. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ. 2007. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 81:5547–5560. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01469-06>.
 37. Muriaux D, Darlix JL, Cimarelli A. 2004. Targeting the assembly of the human immunodeficiency virus type 1. *Curr Pharm Des* 10:3725–3739. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612043382701>.
 38. Sasaki H, Nakamura M, Ohno T, Matsuda Y, Yuda Y, Nonomura Y. 1995. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2026–2030. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.6.2026>.
 39. Cooper J, Liu L, Woodruff EA, Taylor HE, Goodwin JS, D'Aquila RT, Spearman P, Hildreth JEK, Dong X. 2011. Filamin A protein interacts with human immunodeficiency virus type 1 Gag protein and contributes to productive particle assembly. *J Biol Chem* 286:28498–28510. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.239053>.
 40. Wen X, Ding L, Wang J, Qi M, Hammonds J, Chu H, Chen X, Hunter E, Spearman P. 2014. ROCK1 and LIM kinase modulate retrovirus particle release and cell-cell transmission events. *J Virol* 88:6906–6921. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00023-14>.
 41. Chen C, Jin J, Rubin M, Huang L, Sturgeon T, Weixel KM, Stolz DB, Watkins SC, Bamburg JR, Weisz OA, Montelaro RC. 2007. Association of gag multimers with filamentous actin during equine infectious anemia virus assembly. *Curr HIV Res* 5:315–323. <http://dx.doi.org/10.2174/157016207780636542>.
 42. Chen C, Weisz OA, Stolz DB, Watkins SC, Montelaro RC. 2004. Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol* 78:882–891. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.2.882-891.2004>.
 43. Lehmann M, Nikolic DS, Piguet V. 2011. How HIV-1 takes advantage of the cytoskeleton during replication and cell-to-cell transmission. *Viruses* 3:1757–1776. <http://dx.doi.org/10.3390/v3091757>.
 44. Stolp B, Abraham L, Rudolph JM, Fackler OT. 2010. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *J Virol* 84:3935–3948. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02467-09>.
 45. Stolp B, Reichman-Fried M, Abraham L, Pan X, Giese SI, Hannemann S, Goulimari P, Raz E, Grosse R, Fackler OT. 2009. HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of cofilin. *Cell Host Microbe* 6:174–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.004>.
 46. Noble C, Rudnicka D, Hasan M, Aulner N, Porrot F, Machu C, Renaud O, Prévost M, Hivroz C, Schwartz O, Sol-Foulon N. 2010. HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia, and modulates migration of infected lymphocytes. *J Virol* 84:2282–2293. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02230-09>.
 47. Chichili GR, Rodgers W. 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66:2319–2328. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0022-6>.
 48. Sechi AS, Wehland J. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113(Part 21):3685–3695.
 49. Tybulewicz VLJ, Henderson RB. 2009. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9:630–644. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2606>.
 50. Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:690–701. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2476>.
 51. Burbach BJ, Medeiros RB, Mueller KL, Shimizu Y. 2007. T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev* 218:65–81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00527.x>.
 52. Knaus UG, Bokoch GM. 1998. The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* 30:857–862. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00059-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00059-4).
 53. Takenawa T, Miki H. 2001. Wasp and wave family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114:1801–1809.
 54. Vicente-Manzanares M, Rey M, Pérez-Martínez M, Yáñez-Mó M, Sancho D, Cabrero JR, Barreiro O, de la Fuente H, Itoh K, Sánchez-Madrid F. 2003. The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J Immunol* 171:1023–1034. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.1023>.
 55. Audoly G, Popoff MR, Gluschkof P. 2005. Involvement of a small GTP binding protein in HIV-1 release. *Retrovirology* 2:48. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-2-48>.
 56. Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J. 2012. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV type 1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:913–922. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2011.0180>.
 57. Fackler OT, Lu X, Frost JA, Geyer M, Jiang B, Luo W, Abo A, Alberts AS, Peterlin BM. 2000. p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol Cell Biol* 20:2619–2627. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.7.2619-2627.2000>.
 58. Abou-Kheir W, Isaac B, Yamaguchi H, Cox D. 2008. Membrane targeting of wave2 is not sufficient for wave2-dependent actin polymerization: a role for irsp53 in mediating the interaction between rac and wave2. *J Cell Sci* 121:379–390. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.010272>.
 59. Lee SH, Dominguez R. 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 29:311–325. <http://dx.doi.org/10.1007/s10059-010-0053-8>.
 60. Harmon B, Campbell N, Ratner L. 2010. Role of Abl kinase and the Wave2 signaling complex in HIV-1 entry at a post-hemifusion step. *PLoS Pathog* 6:e1000956. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000956>.
 61. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871–875. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0997-871>.
 62. Burniston MT, Cimarelli A, Colgan J, Curtis SP, Luban J. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* 73:8527–8540.
 63. Thomas CL, Steel J, Prestwich GD, Schiavo G. 1999. Generation of phosphatidylinositol-specific antibodies and their characterization. *Biochem Soc Trans* 27:648–652.
 64. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
 65. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7618–7623. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307512101>.
 66. López-Huertas MR, Callejas S, Abia D, Mateos E, Dopazo A, Alcami J, Coiras M. 2010. Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res* 38:3287–3307. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq037>.
 67. Harmon B, Ratner L. 2008. Induction of the Galpha(q) signaling cascade by the human immunodeficiency virus envelope is required for virus entry. *J Virol* 82:9191–9205. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00424-08>.
 68. Pontow SE, Heyden NV, Wei S, Ratner L. 2004. Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J Virol* 78:7138–7147. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.13.7138-7147.2004>.
 69. Halstead JR, Savaskan NE, van den Bout I, Van Horck F, Hajdo-Milasovic A, Snell M, Keune W, Ten Klooster J, Hordijk PL, Divecha N. 2010. Rac controls PIP5K localisation and PtdIns(4,5)P2 synthesis, which modulates vinculin localisation and neurite dynamics. *J Cell Sci* 123:3535–3546. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.062679>.
 70. Weernink PAO, Meletiadis K, Hommeltenberg S, Hinz M, Ishihara H, Schmidt M, Jakobs KH. 2004. Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* 279:7840–7849. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312737200>.
 71. Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the

- control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76:593–627. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>.
72. Lebensohn AM, Kirschner MW. 2009. Activation of the wave complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* 36:512–524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.024>.
 73. Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai ET, Abo A, Peterlin BM. 1996. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr Biol* 6:1677–1684. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70792-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70792-6).
 74. Rauch S, Pulkkinen K, Saksela K, Fackler OT. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 nef recruits the guanine exchange factor vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity. *J Virol* 82:2918–2929. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02185-07>.
 75. Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD. 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 4:e435. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040435>.
 76. Mariani C, Desdouits M, Favard C, Benaroch P, Muriaux DM. 2014. Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4(+) T cells and macrophages. *Front Microbiol* 5:312. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00312>.
 77. Gowrishankar K, Ghosh S, Saha S, C R, Mayor S, Rao M. 2012. Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell* 149:1353–1367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.008>.
 78. Spear M, Guo J, Turner A, Yu D, Wang W, Meltzer B, He S, Hu X, Shang H, Kuhn J, Wu Y. 2014. HIV-1 triggers WAVE2 phosphorylation in primary CD4 T cells and macrophages, mediating Arp2/3-dependent nuclear migration. *J Biol Chem* 289:6949–6959. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.492132>.
 79. Loomis RJ, Holmes DA, Elms A, Solski PA, Der CJ, Su L. 2006. Citron kinase, a RhoA effector, enhances HIV-1 virion production by modulating exocytosis. *Traffic* 7:1643–1653. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00503.x>.
 80. Tybulewicz VLJ, Ardouin L, Prisco A, Reynolds LF. 2003. Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol Rev* 192:42–52. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00032.x>.
 81. Fackler OT, Luo W, Geyer M, Alberts AS, Peterlin BM. 1999. Activation of vav by nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol Cell* 3:729–739. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)80005-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(01)80005-8).
 82. García-Bernal D, Pardo-Cabañas M, Dios-Esponera A, Samaniego R, Hernán de la Ossa DH-P, Teixidó J. 2009. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31:953–964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.021>.
 83. Sol-Foulon N, Sourisseau M, Porrot F, Thoulouze M, Trouillet C, Nobile C, Blanchet F, di Bartolo V, Noraz N, Taylor N, Alcover A, Hivroz C, Schwartz O. 2007. Zap-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. *EMBO J* 26:516–526. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601509>.
 84. Carlson L, de Marco A, Oberwinkler H, Habermann A, Briggs JAG, Kräusslich H, Grünewald K. 2010. Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog* 6:e1001173. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001173>.
 85. Stauffer S, Rahman SA, de Marco A, Carlson L, Glass B, Oberwinkler H, Herold N, Briggs JAG, Müller B, Grünewald K, Kräusslich H. 2014. The nucleocapsid domain of Gag is dispensable for actin incorporation into HIV-1 and for association of viral budding sites with cortical F-actin. *J Virol* 88:7893–7903. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00428-14>.

Annexe 3 : Publication d'une mini-revue

Mariani C, Desdouits M, Favard C, Benaroch P, Muriaux DM. **Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4(+) T cells and macrophages.** Front Microbiol. 2014 Jun 25;5:312



Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4⁺ T cells and macrophages

Charlotte Mariani^{1†}, Marion Desdouits^{2†}, Cyril Favard¹, Philippe Benaroch² and Delphine M. Muriaux^{1*}

¹ Membrane Domains and Viral Assembly, CNRS UMR-5236, Centre d'étude d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Montpellier, Cedex, France

² Intracellular Transport and Immunity, Immunité et Cancer, Institut Curie - Inserm U932, Paris, France

Edited by:

Jamil S. Saad, University of Alabama at Birmingham, USA

Reviewed by:

Carol Carter, Stony Brook University, USA

Paul Spearman, Emory University, USA

*Correspondence:

Delphine M. Muriaux, CNRS UMR-5236, Centre d'étude d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, 1919, Route de Mende, 34293 Montpellier, Cedex, France
e-mail: delphine.muriaux@cpbs.cnrs.fr

[†] These authors have contributed equally to this work.

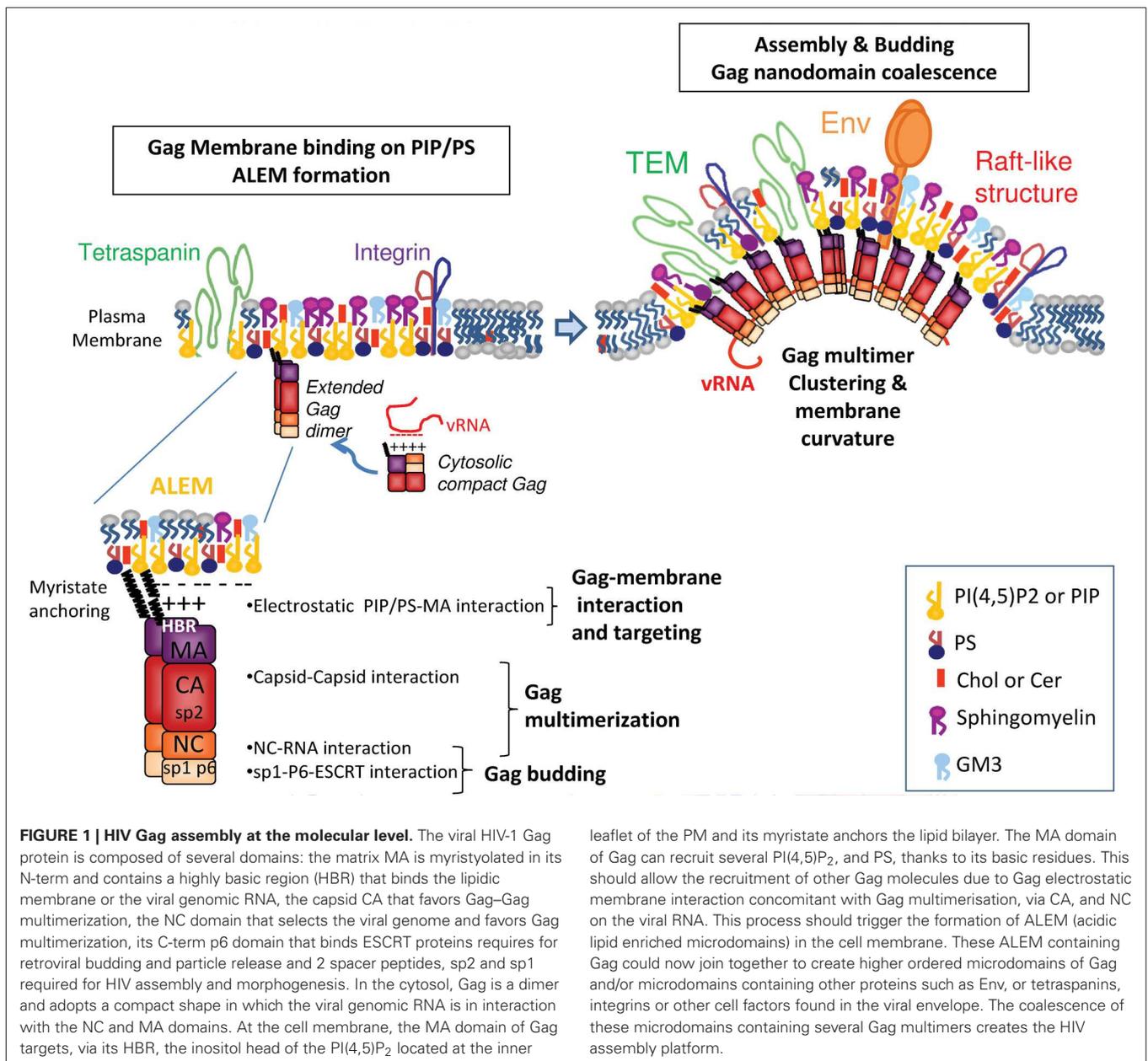
HIV-1 is an RNA enveloped virus that preferentially infects CD4⁺ T lymphocytes and also macrophages. In CD4⁺ T cells, HIV-1 mainly buds from the host cell plasma membrane. The viral Gag polyprotein targets the plasma membrane and is the orchestrator of the HIV assembly as its expression is sufficient to promote the formation of virus-like particles carrying a lipidic envelope derived from the host cell membrane. Certain lipids are enriched in the viral membrane and are thought to play a key role in the assembly process and the envelop composition. A large body of work performed on infected CD4⁺ T cells has provided important knowledge about the assembly process and the membrane virus lipid composition. While HIV assembly and budding in macrophages is thought to follow the same general Gag-driven mechanism as in T-lymphocytes, the HIV cycle in macrophage exhibits specific features. In these cells, new virions bud from the limiting membrane of seemingly intracellular compartments, where they accumulate while remaining infectious. These structures are now often referred to as Virus Containing Compartments (VCCs). Recent studies suggest that VCCs represent intracellularly sequestered regions of the plasma membrane, but their precise nature remains elusive. The proteomic and lipidomic characterization of virions produced by T cells or macrophages has highlighted the similarity between their composition and that of the plasma membrane of producer cells, as well as their enrichment in acidic lipids, some components of raft lipids and in tetraspanin-enriched microdomains. It is likely that Gag promotes the coalescence of these components into an assembly platform from which viral budding takes place. How Gag exactly interacts with membrane lipids and what are the mechanisms involved in the interaction between the different membrane nanodomains within the assembly platform remains unclear. Here we review recent literature regarding the role of Gag and lipids on HIV-1 assembly in CD4⁺ T cells and macrophages.

Keywords: HIV-1, lipids, assembly, Gag, CD4⁺ T cells, macrophages

THE ROLE OF GAG IN HIV ASSEMBLY

For proper assembly of newly synthesized virions, the different viral and cellular components of HIV have to be addressed to the assembly site. The polyprotein Gag is the major structural orchestrator of the assembly process (Cimarelli and Darlix, 2002). Beside Gag itself, GagPol polyproteins, the envelop (Env) glycoprotein (Checkley et al., 2011) and the viral genomic RNA (gRNA) are recruited to the assembly site (Muriaux and Darlix, 2010; O'Carroll et al., 2013). In addition, host cell factors are required for proper trafficking of the viral constituents, as well as for virus assembly and budding. The nature of the host cell factors and their incorporation into new virions can vary depending on the producer cell and thus may impact HIV-1 infectivity (reviewed in Iordanskiy et al., 2013). Nevertheless, Gag expression alone is sufficient for virus-like particle (VLP) production. Gag is synthesized in the cytosol as a 55 kDa polyprotein comprising several domains that are cleaved into independent proteins after

budding: the Matrix (MA), the Capsid (CA), the Nucleocapsid (NC) and the p6 domain (**Figure 1**). Gag is targeted to the site of budding where it interacts with the membrane and multimerizes. Viral assembly requires Gag–Gag interactions that can occur at different levels: MA–MA interactions upon MA–membrane interactions, CA–CA interactions and NC–NC interactions via the genomic RNA (gRNA) (**Figure 1**). The gRNA is recruited to the nascent viral particle via a selective interaction between its Psi encapsidation sequence and the NC domain of Gag (Muriaux and Darlix, 2010; Lu et al., 2011). The formation of VLPs at the plasma membrane (PM) of infected cells requires the myristoylation of Gag (Bryant and Ratner, 1990; Resh, 2005) and the presence of a highly basic region (HBR) in the N-term of MA for Gag anchoring into the cell membrane lipid bilayer (Chukkapalli and Ono, 2011). Other amino acids in the vicinity of MA/membrane interface could also be involved but have not yet been described. In this review, we will focus on the Gag-driven viral assembly



process in HIV-1-infected T cells and macrophages. The recognition between Gag preassembling complexes and the Env will not be developed here and has been reviewed by others (Checkley et al., 2011).

HIV PRODUCING CELLS: CD4⁺ T-CELLS AND MACROPHAGES

HIV-1 mainly infects activated CD4⁺ helper T cells *in vivo* (Freed and Martin, 2001). Most infected activated T cells produce large amounts of new virions and die of apoptosis. A minority acquire a memory phenotype and progress to latently infected cells, able to survive for decades in the absence of virus production (Kuritzkes D.R., 2007). Upon arrest of therapy, these cells can be activated and participate in the rebound in HIV-1 titers, and are therefore important reservoirs of the virus. HIV-1 assembly, budding and release from CD4⁺ T cells occurs mainly at the

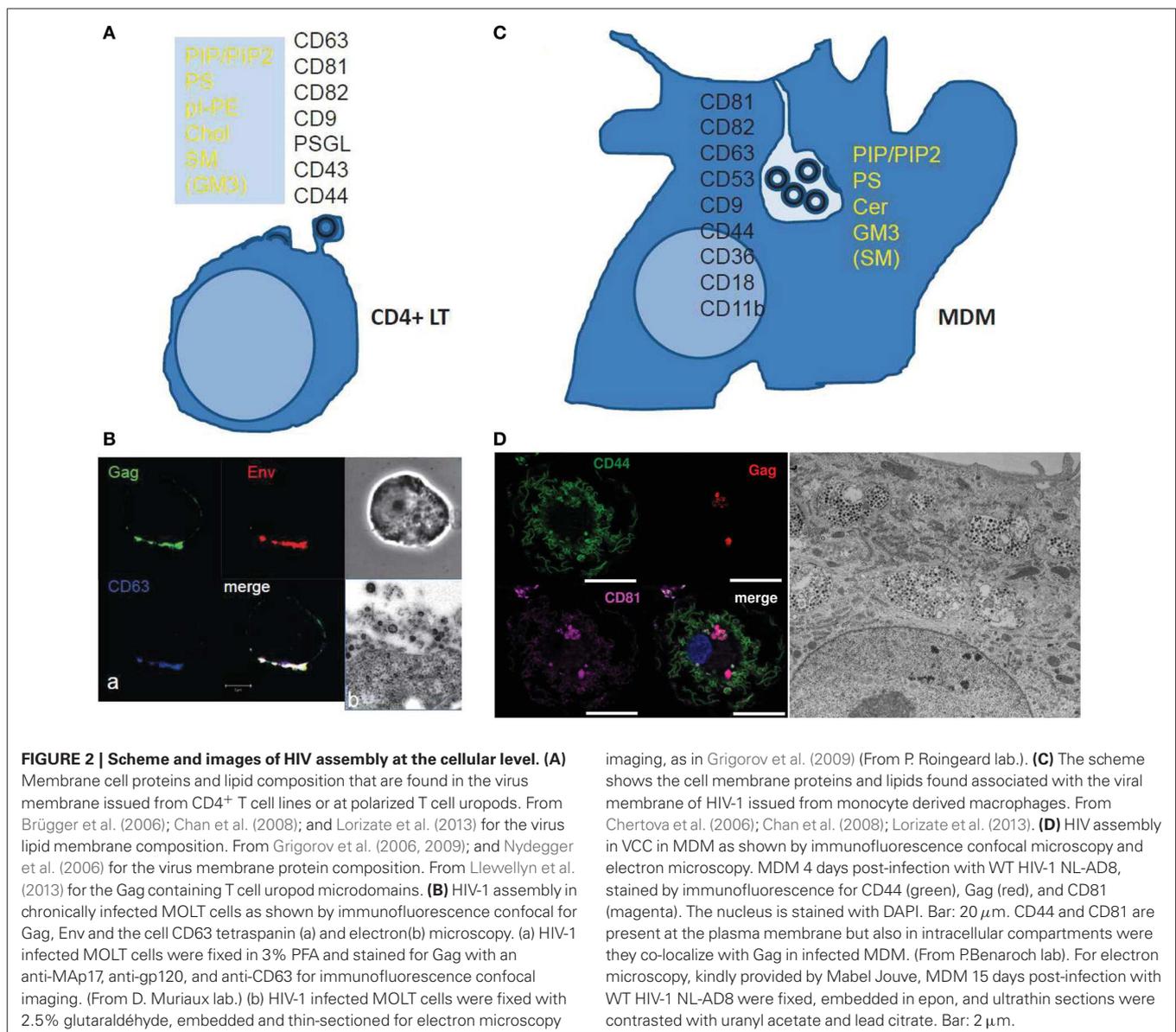
plasma membrane (PM). In polarized CD4⁺ T-cells, HIV components for assembly, such as Gag and the genomic RNA are localized at the uropod membrane as shown by live cell fluorescence microscopy (Hatch et al., 2013; Llewellyn et al., 2013). An exception among T cells are the chronically-infected MOLT lymphoblasts in which infectious HIV-1 are found in intracellular compartments (Grigorov et al., 2006).

Macrophages are the other main cellular target of HIV. They play important roles during HIV infection and AIDS progression due to their specific features (Koppensteiner et al., 2012). Infected macrophages have been found in all tissues such as the vaginal mucosa, the brain and the lung (Gartner et al., 1986; Shen et al., 2009; Jambo et al., 2014), where they remain infectious for long periods of time (Sharova et al., 2005). In contrast with T cells, macrophages resist HIV-induced cytopathic effects for months

in vitro as well as *in vivo* (Koppensteiner et al., 2012). They accumulate virions in large intracytoplasmic vacuoles (Orenstein et al., 1988), that are often referred to as VCCs (Virus-Containing Compartments) (Figure 2C) or IPMCS (Intracellular Plasma Membrane-Connected Compartments) (Mlcochova et al., 2013). Electron microscopy studies of infected macrophages revealed budding profiles at the limiting membrane of the VCC and the presence of immature virion in the lumen of the compartments, demonstrating that VCCs represent the site of HIV assembly in macrophages (Orenstein, 1998; Raposo et al., 2002; Pelchen-Matthews, 2003; Jouve et al., 2007). Newly formed viral particles accumulate in the VCC lumen and VCCs tend therefore to fill up with time (Gaudin et al., 2013). Early on, VCCs were classified as late endosomes or multivesicular bodies because of their endosomal markers and their morphology (Raposo et al., 2002; Pelchen-Matthews, 2003). However, they were later shown to be inaccessible to BSA-gold, devoid of EEA1 (Deneka et al., 2007;

Jouve et al., 2007) and to possess a neutral luminal pH (Jouve et al., 2007), suggesting that they were not true endosomes. The lumen of the VCCs can be transiently accessible to extracellular molecules (Deneka et al., 2007; Berre et al., 2013; Gaudin et al., 2013) possibly through direct tubular connections to the PM (Welsch et al., 2007; Bennett et al., 2009). VCCs are now regarded as specialized, intracellular sequestered portions of the PM, possibly with dynamic connections to the extracellular milieu (Gaudin et al., 2013; Mlcochova et al., 2013), for reviews see Benaroch et al. (2010) and Tan and Sattentau (2013).

The two main cellular targets of HIV, CD4⁺ T cells and macrophages, exhibit very different morphology, function and physiology. The assembly site of HIV in both cell types appears different: the PM of small round T-lymphocytes versus the internal convoluted membrane meshwork of large macrophages (Figure 2). This raises the question of the cell specificity for the mechanism(s) underlying virus assembly and for the lipid



membrane composition of produced virions. Most studies pertaining to the role of Gag and lipids in HIV assembly in live cells used T-cell lines or adherent epithelial cell lines, with only few results confirmed in human primary T-cells or monocyte-derived macrophages (MDM), the classical culture model for macrophages. However, we will see below that most observations and mechanistic hypotheses regarding the role of membrane lipids in HIV assembly can apply for T-cells and macrophages.

COMPOSITION OF HIV ASSEMBLY SITES IN T CELLS AND MACROPHAGES

TETRASPANIN-ENRICHED MICRODOMAINS

In primary T-cells and T-cell lines, Gag accumulates in specific domains of the PM containing the tetraspanins CD9, CD63, CD81, and CD82 that are referred to as Tetraspanin Enriched Microdomains (TEM) (Booth et al., 2006; Grigorov et al., 2006; Nydegger et al., 2006). These tetraspanins are present in subdomains of the PM of HIV-infected T cells together with Gag and Env as shown by immunofluorescence analysis and immunoprecipitation (Jolly and Sattentau, 2007; Grigorov et al., 2009) (Figures 2A,B). In addition, virions released and purified from these cells are associated with the same tetraspanins (Grigorov et al., 2009). HIV-infected and polarized T-cells possess “specific uropod-directed microdomains” that contain PSGL-1 (P-Selectin Glyco- protein Ligand 1), CD43 and CD44 (Figure 2A) where Gag localizes due to its NC and MA regions (Llewellyn et al., 2013).

In infected macrophages, TEMs are also a component of the assembly site of HIV and the same tetraspanins are enriched at the VCC limiting membrane as revealed by immunofluorescence and electron microscopy (Figure 2C) (Deneka et al., 2007; Gaudin et al., 2013; Mlcochova et al., 2013). This is also reflected by the composition of virions produced by macrophages, which harbor several tetraspanins (CD9, CD81, CD82, CD53, CD63) as assessed by mass spectrometry (Chertova et al., 2006). These virions also contain other proteins enriched in the VCCs, such as CD44, CD18, and CD11b, further highlighting that the envelope of the virus derives from the membrane of the VCC (Figures 2C,D). Interestingly, the limiting membrane of the VCC as well as the virions present in the VCC of infected macrophages contains the scavenger receptor CD36, which represents so far the first macrophage specific marker of the viral assembly site as compared to T lymphocytes (Berre et al., 2013).

VIRUS MEMBRANE LIPID COMPOSITION

Lipidomic analysis of HIV virions has provided important information regarding the nature of the membrane domains where the viral budding takes place (Aloia et al., 1993; Brügger et al., 2006; Chan et al., 2008; Lorizate et al., 2013). Early work revealed that HIV-1 and HIV-2 virions were enriched in cholesterol when compared to the PM of producer cells H9 T-cells, suggesting that HIV buds from specific domains of the PM (Aloia et al., 1993). Later, Chan et al. showed that virions from T cells were mainly enriched in acidic lipids (PI, PIP₂, PS), GM3, cholesterol and SM (Chan et al., 2008), a composition close to that of “rafts-like” domains. However, the HIV assembly site exhibits some differences with these domains since the GM1 raft lipid and the CD55 raft protein

were only transiently found trapped in viral assembly sites, at least in adherent cell lines (Krementsov et al., 2010). The dynamics of other lipids have not been studied during Gag assembly in living primary host cells and should be investigated in order to validate the role of lipids in HIV assembly and budding or the role of Gag in the formation of lipidic domains. A recent study done on MT4 T cells showed an enrichment in PS, PI, pl-PE, PG, and hexCer but not Cholesterol in the virus particles when compared to the PM (Lorizate et al., 2013). This suggested that the HIV envelope composition can vary as a function of the membrane composition of the producer cell or depends on experimental conditions, such as techniques used to purify the PM (Lorizate et al., 2013) or to separate viral particles from microvesicles shed by the cells (Chertova et al., 2006; Chan et al., 2008; Coren et al., 2008). However, a constant observation is the enrichment in glycosphingolipids (Cer or SM) and/or Cholesterol that could locally order the virion bud membrane and in an acidic phospholipid (PI, PIP₂, or PS) that is required for Gag membrane recruitment (see below). Figure 2A summarizes the lipidic and proteic enrichment of HIV envelope composition in T-lymphocytes and MDM.

Only one study so far investigated the lipidomic composition of HIV virions produced by macrophages (Chan et al., 2008). It showed that, when compared to the PM of the macrophages, viral particles are enriched in phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol (PIP, PIP₂), the glycosphingolipid GM3 and to a lesser extent sphingomyelin but not in cholesterol. HIV virions from macrophages are also enriched in ceramide, which may be a sign of coalescence of other lipid nanodomains into bigger domains at the level of the assembly platform. Importantly, Chan et al. compared HIV virions produced by T-cells and macrophages. Both types of virions exhibited a very similar lipidic composition while the global PM composition was different in macrophages as compared to T-cells (Chan et al., 2008). These data suggest that HIV is able to reach or to create a favorable lipidic environment containing the components necessary for its assembly and budding in both cell types.

Thus, in macrophages as in T cells, HIV assembles at and buds from specific membranes enriched in acidic lipids, sterols and/or glycosphingolipids (reviewed in Kerviel et al., 2013). Nevertheless, the fine mechanism underlying Gag targeting to such PM domains remains unclear.

GAG TARGETING TO THE VIRAL BUDDING SITE

Gag synthesis occurs in the cytoplasm where it is myristoylated (Bryant and Ratner, 1990). Gag selectively interacts with the genomic RNA from which it has been translated (de Breyne et al., 2013). Then Gag is targeted to the cell PM (Kutluay and Bieniasz, 2010) either by transport as minimal Gag-RNA complexes or simply by diffusion. At this point, cytosolic Gag is probably in a low dimerization state (Kutluay and Bieniasz, 2010) and in a compact conformation likely in interaction with the viral RNA (Figure 1) (Datta et al., 2007; Munro et al., 2014) and should reach the plasma membrane for assembly.

GAG INTERACTION WITH THE PLASMA MEMBRANE: A ROLE FOR PI(4,5)P₂

The MA domain of Gag can bind lipids at the inner surface of the cell PM where Gag multimerizes, thanks to its myristate

(Bryant and Ratner, 1990) and its Highly Basic Region (HBR) (Ono, 2009). Based on biophysical experiments, conformations of a monomeric form of HIV-1 Gag were analyzed in solution, and the results revealed that Gag can adopt a compact conformation (Datta et al., 2007). Single molecule FRET experiments and FCS revealed that upon assembly into VLP, Gag undergoes a conformational transition from compact to an extended form (Munro et al., 2014). It has been proposed that upon its interaction with membrane phospholipids and during its multimerization, Gag adopts an extended conformation, similar to the one observed in immature virus. This process is triggered by the interaction of the HBR at the N-ter of MA with the PM PI(4,5)P₂ phospholipid (Ono et al., 2004a; Saad et al., 2006; Chukkapalli et al., 2008). In addition, the genomic RNA and the PI(4,5)P₂ are probably in competition for the binding of the MA HBR (Chukkapalli et al., 2010). This suggests that under its compact conformation, Gag is able to interact with the genomic RNA through the MA HBR as well as through the NC and as soon as Gag is in the vicinity of a PI(4,5)P₂ containing membrane, it switches to the extended conformation which the HBR interacts with PI(4,5)P₂. Thus, it appears that MA-membrane binding requires the anchoring of the N-term MA myristate in the membrane lipid bilayer, a change of Gag conformation from a compact to an extended rod-like shape, and the electrostatic interaction between the charged sugar head of phospholipids (such as PI(4,5)P₂ and PS) and the MA HBR (Figure 1).

PI(4,5)P₂ facilitates Gag-membrane binding to the plasma membrane in T cells and is required for efficient virus release (Monde et al., 2011). However, in T cells engineered to express low levels of PI(4,5)P₂, the virus particle production can still occur, suggesting that the MA domain of Gag can probably interact with other charged acidic lipids, such as PS, as reported by lipidomic analysis of HIV virions (Lorizate et al., 2013). Interestingly, in these T cells, the virus adapted to compensate the lack of PI(4,5)P₂ by a “charged” mutation in MA (L74R) that enhances virus infectivity (Monde et al., 2011). The role for PI(4,5)P₂ dependence for virus release remains unclear and may involve other cellular lipids or proteins or a cell signaling cascade. This interaction regulates the proper targeting of the viral components to the assembly site. Indeed, mutations of the HBR MA domain induce re-localization of Gag from the PM to CD63⁺ intracellular compartments in HeLa and in T cells (Ono et al., 2004b).

In macrophages, both WT and MA-mutant Gag co-localize with a subpopulation of CD63⁺ compartments (Ono et al., 2004b; Gousset et al., 2008). However, it is unclear whether these CD63⁺ compartments represented true VCCs, since few other VCC specific markers were used in these studies (Ono et al., 2004a; Gousset et al., 2008). Importantly, PI(4,5)P₂ was detected at the limiting membrane of intracellular CD81⁺, CD44⁺, or Gag⁺ compartments and at the PM in infected macrophages (Mlcochova et al., 2013). Together, these results suggest that the basic region of the MA domain may contribute to Gag targeting to the VCC through phospholipid binding, in MDM as in T-cells. In addition, other unknown factors may be required to regulate this targeting (Ono et al., 2004b; Gousset et al., 2008; Mlcochova et al., 2013).

OTHER RETROVIRUSES

The mechanism by which the HBR of retroviral MA (Murray et al., 2005) binds the PM PI(4,5)P₂ phospholipid is likely to be general for many retroviruses such as HIV-1 (Ono et al., 2004a; Saad et al., 2006; Chukkapalli et al., 2008), HIV-2 (Saad et al., 2008), EIAV (Chen et al., 2008), MLV (Hamard-Peron et al., 2010), and MPMV (Prchal et al., 2012). It is controversial for Rous Sarcoma Virus (RSV) as some authors have found that *in vitro* RSV MA binding to membranes requires acidic lipids like PS but not PI(4,5)P₂ (Chan et al., 2011). In addition, no effect of the phosphatase-mediated depletion of PI(4,5)P₂ was reported on RSV Gag cellular localization and VLP production. In contrary, another study described, in a cellular context, that the presence of PI(4,5)P₂, and/or PI(3,4,5)P₃, is required for RSV Gag targeting to the PM and for virus release in a NC-dependent Gag multimerization manner (Nadaraia-Hoke et al., 2013). In the case of EIAV, MA has greater affinity for PI(3)P than PI(4,5)P₂, as shown *in vitro* by NMR lipid titration. Interfering with the metabolism of PI(3)P, but not of PI(4,5)P₂, prevents EIAV assembly and release, indicating a slight difference of PI recognition for this retrovirus compared to others (Fernandes et al., 2011). Only one retroviral Gag seems to make an exception, as HTLV-1 MA does not require PI(4,5)P₂ interaction to trigger Gag targeting and membrane binding (Inlora et al., 2011).

GAG-DRIVEN CONSTRUCTION OF THE ASSEMBLY PLATFORM

Differences in lipid composition between HIV envelop and the host cell PM suggest, as mentioned earlier, that the virus buds from a specific Gag-containing membrane domain. Gag could either bind these pre-formed lipidic and proteic microdomains at the PM, or induce their formation by segregating the components through electrostatic interactions and Gag multimerization.

ACIDIC LIPID ENRICHED MICRODOMAINS (ALEM)

We hypothesize that Gag alone or minimal Gag-RNA complexes are targeted to the PM not only by the electrostatic interaction of the HBR region of MA with the PI(4,5)P₂/PS lipids, but also by Gag multimerization via its CA/CA interaction and NC/RNA interaction. The stabilization of the MA—membrane interaction appears to rely on the insertion of the myristate into the lipid bilayer (Charlier et al., 2014), as well on the interaction of the HBR motif with the sugar head of PI(4,5)P₂ and consequently on Gag multimerization. Other cellular cofactors of membrane microdomain formation such as cortical actin (unpublished data) or tetraspanin web (Thali, 2009) could contribute to the stabilization of Gag multimers at the cell PM. We propose that upon Gag—membrane interaction, Gag multimerization triggers the formation of acidic lipid enriched microdomains (ALEM) at the inner leaflet of the cell membrane (Kerviel et al., 2013) as it has been shown by dynamic coarse grained modeling of HIV-1 MA anchoring in a lipidic membrane (Charlier et al., 2014). The generation of ALEM by Gag itself is likely due to lipid sequestering induced by electrostatic interaction as reported before for other cellular proteins (van den Bogaart et al., 2011). This early event certainly generates nanodomains smaller than the size of a virus bud and different from rafts. Then viral assembly could propagate

either by expansion of these nanodomains or by coalescence of several Gag-enriched membrane nanodomains to form the final viral bud.

MICRODOMAINS COALESCENCE

The formation of ALEM by higher order Gag multimer formation could then drain other microdomains of the external leaflet of the cell PM such as tetraspanin-enriched microdomains (TEM) or rafts, that contain other lipids like Ceramide, Cholesterol, Sphingomyelin and proteins such as tetraspanins (Yanez-Mo et al., 2009) or the embedded Env glycoproteins (Checkley et al., 2011). Coalescence of nanodomains has been reported for Gag with “rafts-like” membrane domains and TEM in HeLa cells (Krementsov et al., 2010; Hogue et al., 2011). This model is supported by the work of Ono and co-workers, with antibody-mediated copatching and FRET assays (Hogue et al., 2011) conducted on adherent HeLa cells expressing HIV-1. Interactions between Gag and the inner leaflet of PM appear to induce the coalescence of TEM and lipid raft at the viral assembly site. This is also in line with a model where Gag does not associate with pre-existing virus-sized microdomains organized by cellular factors, but rather functions as a microdomain-organizing factor to create novel virus-induced microdomains in a stepwise manner during the course of assembly (Krementsov et al., 2010; Hogue et al., 2011; Kerviel et al., 2013).

In this model (Figure 1), Gag recruits PI(4,5)P₂ upon its binding to the membrane, then its multimerization induces the formation of ALEM in the inner leaflet of the membrane, which further triggers the coalescence of other nanodomains of the outer leaflet of the membrane, such as lipid rafts and TEM (Kerviel et al., 2013; Charlier et al., 2014).

In polarized CD4⁺ T cells, such advanced studies have not been done, but Ono and co-workers have shown that HIV-1 Gag assembly occurs in uropod-specific microdomains and that this Gag localization depends on higher order NC dependent multimerization of Gag (Llewellyn et al., 2010), in agreement with the model proposed above. In macrophages, studies that pertain to the molecular interactions driving the construction of the assembly platform are still lacking. Considering that Gag assembly is a sequential process and several molecules are required to form higher ordered microdomains, Gag-acidic lipid nanodomains certainly fuse together. In addition, they can get enriched in other lipids via the coalescence with other surrounding nanodomains containing cell membrane proteins such as CD81 tetraspanin (Nydegger et al., 2006; Grigorov et al., 2009) or other lipids from the upper bilayer, such as SM and GM3 (Chan et al., 2008).

A ROLE FOR CHOLESTEROL?

Gag could directly sense other lipids than PIP₂, like cholesterol (Dick et al., 2012). Depletion of cellular cholesterol markedly and specifically reduced HIV-1 particle production (Ono and Freed, 2001). Drug-induced redistribution of the cholesterol from the PM to endosomes led to relocation of Gag from the PM to intracellular MVB-like CD63⁺ compartments (Lindwasser and Resh, 2004), suggesting a possible role for cholesterol in Gag targeting to assembly sites. However, Gag contains no cholesterol binding motif, unlike other viral proteins with roles in entry or

morphogenesis (Schroeder, 2010). Several studies have proposed that HIV-1 regulates the levels of cellular cholesterol, presumably to achieve efficient viral egress. A Nef-induced decrease of the ABCA1-dependent efflux of cholesterol to the Apolipoprotein A1 has been reported (Mujawar et al., 2006; Morrow et al., 2010), leading to increased cholesterol in lipid rafts (Cui et al., 2012). This mechanism is likely involved in HIV-associated dyslipidemia as observed in macaques infected by SIV (Asztalos et al., 2010). However, Nef had no impact on virus content in cholesterol in MT4 T cells (Brügger et al., 2007). Thus, the role of cholesterol in virus budding and infectivity remains to be assessed.

MODULATION OF CALCIUM SIGNALING IN HIV-1 ASSEMBLY AND RELEASE

The PI(4,5)P₂ represents 1–2% of the total phospholipids at the inner leaflet of the cell PM, and it is a key regulator of several cellular processes taking place at the cell PM, such as endocytosis, exocytosis, cytoskeleton attachment and activation of enzymes (reviewed in McLaughlin and Murray, 2005). PI(4,5)P₂ anchors cellular proteins to the PM through Pleckstrin Homology domains that can activate different ion channels located at the PM (Suh and Hille, 2005). PI(4,5)P₂ is also the precursor of second messengers such as inositol(1,4,5)triphosphate (IP₃) or diacylglycerol (DAG). IP₃ can regulate release of Ca²⁺ from internal storages; DAG can activate the protein kinase C (PKC). In the course of HIV assembly and budding, it was suggested a role for intracellular Ca²⁺ increase in boosting virus release (Grigorov et al., 2006; Perlman and Resh, 2006). In addition, calmodulin, CaM, a regulator of intracellular Ca²⁺ concentration, interacts with the N-terminal domain of HIV-1 MA as shown, *in vitro*, by NMR and biochemical experiments (Samal et al., 2011; Vlach et al., 2014). This interaction depends on Ca²⁺ and is able to induce the MA myristate exposure and an extended MA conformational change (Chow et al., 2010; Ghanam et al., 2010; Taylor et al., 2012). In cells, Carter and co-workers have shown that HIV-1 Gag induces Ca²⁺ release from intracellular compartments, probably from the endoplasmic reticulum, by activating the cascade PI(4,5)P₂-PLC-IP₃-IP₃R (Ehrlich et al., 2010; Ehrlich and Carter, 2012). IP₃ receptor and Sprouty2, also regulators of Ca²⁺ signaling, are required for HIV Gag particle release (Ehrlich et al., 2011). Thus, it appears that in addition to the requirement of the PI(4,5)P₂ as a co-factor for HIV-1 Gag targeting to the PM, related lipid metabolism and second messengers or Ca²⁺ signaling are involved in virus particle release. These findings open a new door in the regulation of HIV-1 particle production.

CONCLUSION

CD4⁺ T lymphocytes and macrophages are very different in size, shape and immune functions. The HIV-1 virions produced by CD4⁺ T cells or macrophages carry specific lipids and cellular proteins, incorporated during virus assembly. The cellular components identified so far appear quite similar in both cell types, suggesting that, at the molecular level, Gag-membrane interaction with lipids (and proteins) occurs in a similar way during assembly. This is in line with a model where Gag contains most of the determinants for selecting or creating the best lipidic environment for viral bud formation. We propose that

Gag multimerization will generate an assembly platform containing specific lipid membrane nanodomains through its interaction with selective lipids. The creation of this assembly platform in the inner layer of the PM, probably recruits the nanodomains enriched in other proteo-lipid domains present in the upper layer.

Finally, all the components involved in the PM structure and signaling (i.e., lipid metabolism, calcium mobilization and/or actin cytoskeletal reorganization) may contribute to the assembly process of enveloped viruses. Deciphering the complex process of assembly, will require the identification of additional cellular proteins that have yet to be discovered.

REFERENCES

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5181–5185. doi: 10.1073/pnas.90.11.5181
- Asztalos, B. F., Mujawar, Z., Morrow, M. P., Grant, A., Pushkarsky, T., Wanke, C., et al. (2010). Circulating NEF induces dyslipidemia in simian immunodeficiency virus-infected Macaques by suppressing cholesterol efflux. *J. Infect. Dis.* 202, 614–623. doi: 10.1086/654817
- Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., and Jouve, M. (2010). HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29. doi: 10.1186/1742-4690-7-29
- Bennett, A. E., Narayan, K., Shi, D., Hartnell, L. M., Gousset, K., He, H., et al. (2009). Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 5:e1000591. doi: 10.1371/journal.ppat.1000591
- Berre, S., Gaudin, R., de Alencar, B. C., Desdouts, M., Chabaud, M., Naffakh, N., et al. (2013). Cd36-specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to t cells. *J. Exp. Med.* 210, 2523–2538. doi: 10.1084/jem.20130566
- Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J.-M., Hildreth, J. E., and Gould, S. J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* 172, 923–935. doi: 10.1083/jcb.200508014
- Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T., and Kräusslich, H.-G. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2641–2646. doi: 10.1073/pnas.0511136103
- Brügger, B., Krautkrämer, E., Tibroni, N., Munte, C. E., Rauch, S., Leibrecht, I., et al. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology* 4, 70. doi: 10.1186/1742-4690-4-70
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 523–527. doi: 10.1073/pnas.87.2.523
- Chan, J., Dick, R. A., and Vogt, V. M. (2011). Rous sarcoma virus gag has no specific requirement for phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate for plasma membrane association *in vivo* or for liposome interaction *in vitro*. *J. Virol.* 85, 10851–10860. doi: 10.1128/JVI.00760-11
- Chan, R., Uchil, P. D., Jin, J., Shui, G., Ott, D. E., Mothes, W., et al. (2008). Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J. Virol.* 82, 11228–11238. doi: 10.1128/JVI.00981-08
- Charlier, L., Louet, M., Chaloin, L., Fuchs, P., Martinez, J., Muriaux, D., et al. (2014). Coarse-grained simulations of the HIV-1 matrix protein anchoring: revisiting its assembly on membrane domains. *Biophys. J.* 106, 577–585. doi: 10.1016/j.bpj.2013.12.019
- Checkley, M. A., Lutge, B. G., and Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J. Mol. Biol.* 410, 582–608. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.042
- Chen, K., Bachtiar, I., Piszczek, G., Bouamr, F., Carter, C., and Tjandra, N. (2008). Solution nmr characterizations of oligomerization and dynamics of equine infectious anemia virus matrix protein and its interaction with pip2. *Biochemistry* 47, 1928–1937. doi: 10.1021/bi701984h
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W., et al. (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 80, 9039–9052. doi: 10.1128/JVI.01013-06
- Chow, J. Y. H., Jeffries, C. M., Kwan, A. H., Guss, J. M., and Trewhella, J. (2010). Calmodulin disrupts the structure of the HIV-1 ma protein. *J. Mol. Biol.* 400, 702–714. doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.022
- 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)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding. *J. Virol.* 82, 2405–2417. doi: 10.1128/JVI.01614-07
- Chukkapalli, V., Oh, S. J., and Ono, A. (2010). Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 1600–1605. doi: 10.1073/pnas.0908661107
- Chukkapalli, V., and Ono, A. (2011). Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 gag. *J. Mol. Biol.* 410, 512–524. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.015
- Cimarelli, A., and Darlix, J. L. (2002). Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1166–1184. doi: 10.1007/s00018-002-8495-6
- Coren, L. V., Shatzer, T., and Ott, D. E. (2008). Cd45 immunofluorescence depletion of vesicles from jurkat t cells demonstrates that exosomes contain cd45: no evidence for a distinct exosome/HIV-1 budding pathway. *Retrovirology* 5, 64. doi: 10.1186/1742-4690-5-64
- Cui, H. L., Grant, A., Mukhamedova, N., Pushkarsky, T., Jennelle, L., Dubrovsky, L., et al. (2012). HIV-1 nef mobilizes lipid rafts in macrophages through a pathway that competes with abca1-dependent cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 53, 696–708. doi: 10.1194/jlr.M023119
- Datta, S. A. K., Curtis, J. E., Ratcliff, W., Clark, P. K., Crist, R. M., Lebowitz, J., et al. (2007). Conformation of the HIV-1 gag protein in solution. *J. Mol. Biol.* 365, 812–824. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.073
- de Breynne, S., Soto-Rifo, R., López-Lastra, M., and Ohlmann, T. (2013). Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic rnas. *Virus Res.* 171, 366–381. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.006
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins cd81, cd9, and cd53. *J. Cell Biol.* 177, 329–341. doi: 10.1083/jcb.200609050
- Dick, R. A., Goh, S. L., Feigenson, G. W., and Vogt, V. M. (2012). HIV-1 gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 18761–18766. doi: 10.1073/pnas.1209408109
- Ehrlich, L. S., and Carter, C. A. (2012). HIV assembly and budding: Ca(2+) signaling and non-escrt proteins set the stage. *Mol. Biol. Int.* 2012, 851670. doi: 10.1155/2012/851670
- Ehrlich, L. S., Medina, G. N., and Carter, C. A. (2011). Sprouty2 regulates pi(4,5)p2/ca2+ signaling and HIV-1 gag release. *J. Mol. Biol.* 410, 716–725. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.069
- Ehrlich, L. S., Medina, G. N., Khan, M. B., Powell, M. D., Mikoshiba, K., and Carter, C. A. (2010). Activation of the inositol (1,4,5)-triphosphate calcium gate receptor is required for HIV-1 gag release. *J. Virol.* 84, 6438–6451. doi: 10.1128/JVI.01588-09
- Fernandes, F., Chen, K., Ehrlich, L. S., Jin, J., Chen, M. H., Medina, G. N., et al. (2011). Phosphoinositides direct equine infectious anemia virus gag trafficking and release. *Traffic* 12, 438–451. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01153.x
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (2001). “HIVs and their replication,” in *Fields Virology*, 4th Edn., eds D. M. Knipe and P. M. Howley (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins), 1971–2041.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Betts, R. F., and Popovic, M. (1986). Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with aids. *JAMA* 256, 2365–2371. doi: 10.1001/jama.1986.03380170081023
- Gaudin, R., Berre, S., de Alencar, B. C., Decalf, J., Schindler, M., Gobert, F.-X., et al. (2013). Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS ONE* 8:e69450. doi: 10.1371/journal.pone.0069450
- Ghanam, R. H., Fernandez, T. F., Fledderman, E. L., and Saad, J. S. (2010). Binding of calmodulin to the HIV-1 matrix protein triggers myristate exposure. *J. Biol. Chem.* 285, 41911–41920. doi: 10.1074/jbc.M110.179093
- Gousset, K., Ablan, S. D., Coren, L. V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., et al. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS Pathog.* 4:e1000015. doi: 10.1371/journal.ppat.1000015
- Grigorov, B., Arcanger, E., Roingeard, P., Darlix, J.-L., and Muriaux, D. (2006). Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and

- T-lymphoblastic cell lines. *J. Mol. Biol.* 359, 848–862. doi: 10.1016/j.jmb.2006.04.017
- Grigorov, B., Attuil-Audenis, V., Perugi, F., Nedelec, M., Watson, S., Pique, C., et al. (2009). A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* 6, 28. doi: 10.1186/1742-4690-6-28
- Hamard-Peron, E., Juillard, F., Saad, J. S., Roy, C., Roingeard, P., Summers, M. F., et al. (2010). Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4,5)P2/PS and a polybasic region in the matrix. *J. Virol.* 84, 503–515. doi: 10.1128/JVI.01134-09
- Hatch, S. C., Sardo, L., Chen, J., Burdick, R., Gorelick, R., Fivash, M. J., et al. (2013). Gag-dependent enrichment of HIV-1 RNA near the uropod membrane of polarized T cells. *J. Virol.* 87, 11912–11915. doi: 10.1128/JVI.01680-13
- Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K., and Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J. Virol.* 85, 9749–9766. doi: 10.1128/JVI.00743-11
- Inlora, J., Chukkapalli, V., Derse, D., and Ono, A. (2011). Gag localization and virus-like particle release mediated by the matrix domain of human T-lymphotropic virus type 1 gag are less dependent on phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate than those mediated by the matrix domain of HIV-1 gag. *J. Virol.* 85, 3802–3810. doi: 10.1128/JVI.02383-10
- Iordanskiy, S., Santos, S., and Bukrinsky, M. (2013). Nature, nurture and HIV: the effect of producer cell on viral physiology. *Virology* 443, 208–213. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.023
- Jambo, K. C., Banda, D. H., Kankwatira, A. M., Sukumar, N., Allain, T. J., Heyderman, R. S., et al. (2014). Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol.* doi: 10.1038/mi.2013.127. [Epub ahead of print].
- Jolly, C., and Sattentau, Q. J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J. Virol.* 81, 7873–7884. doi: 10.1128/JVI.01469-06
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2, 85–95. doi: 10.1016/j.chom.2007.06.011
- Kerviel, A., Thomas, A., Chaloin, L., Favard, C., and Muriaux, D. (2013). Virus assembly and plasma membrane domains: which came first? *Virus Res.* 171, 332–340. doi: 10.1016/j.virusres.2012.08.014
- Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., and Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Retrovirology* 9, 82. doi: 10.1186/1742-4690-9-82
- Krementsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.-E., et al. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* 11, 1401–1414. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01111.x
- Kuritzkes D.R., W. B. (2007). “HIV-1 pathogenesis and clinical manifestations,” in *Fields Virology*, 5th Edn., eds D. M. Knipe and P. M. Howley (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins), 2187–2214.
- Kutluay, S. B., and Bieniasz, P. D. (2010). Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* 6:e1001200. doi: 10.1371/journal.ppat.1001200
- Lindwasser, O. W., and Resh, M. D. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J. Virol.* 78, 6013–6023. doi: 10.1128/JVI.78.11.6013-6023.2004
- Llewellyn, G. N., Grover, J. R., Olety, B., and Ono, A. (2013). HIV-1 gag associates with specific uropod-directed microdomains in a manner dependent on its matrix basic region. *J. Virol.* 87, 6441–6454. doi: 10.1128/JVI.00040-13
- Llewellyn, G. N., Hogue, I. B., Grover, J. R., and Ono, A. (2010). Nucleocapsid promotes localization of HIV-1 gag to uropods that participate in virological synapses between T cells. *PLoS Pathog.* 6:e1001167. doi: 10.1371/journal.ppat.1001167
- Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M. J., Kräusslich, H.-G., et al. (2013). Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cell. Microbiol.* 15, 292–304. doi: 10.1111/cmi.12101
- Lu, K., Heng, X., and Summers, M. F. (2011). Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J. Mol. Biol.* 410, 609–633. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.029
- McLaughlin, S., and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605–611. doi: 10.1038/nature04398
- Mlcochova, P., Pelchen-Matthews, A., and Marsh, M. (2013). Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol.* 11:89. doi: 10.1186/1741-7007-11-89
- Monde, K., Chukkapalli, V., and Ono, A. (2011). Assembly and replication of HIV-1 in T cells with low levels of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *J. Virol.* 85, 3584–3595. doi: 10.1128/JVI.02266-10
- Morrow, M. P., Grant, A., Mujawar, Z., Dubrovsky, L., Pushkarsky, T., Kiselyeva, Y., et al. (2010). Stimulation of the liver X receptor pathway inhibits HIV-1 replication via induction of ATP-binding cassette transporter a1. *Mol. Pharmacol.* 78, 215–225. doi: 10.1124/mol.110.065029
- Mujawar, Z., Rose, H., Morrow, M. P., Pushkarsky, T., Dubrovsky, L., Mukhamedova, N., et al. (2006). Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol.* 4:e365. doi: 10.1371/journal.pbio.0040365
- Munro, J. B., Nath, A., Färber, M., Datta, S. A. K., Rein, A., Rhoades, E., et al. (2014). A conformational transition observed in single HIV-1 gag molecules during *in vitro* assembly of virus-like particles. *J. Virol.* 88, 3577–3585. doi: 10.1128/JVI.03353-13
- Muriaux, D., and Darlix, J.-L. (2010). Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol.* 7, 744–753. doi: 10.4161/rna.7.6.14065
- Murray, P. S., Li, Z., Wang, J., Tang, C. L., Honig, B., and Murray, D. (2005). Retroviral matrix domains share electrostatic homology: models for membrane binding function throughout the viral life cycle. *Structure* 13, 1521–1531. doi: 10.1016/j.str.2005.07.010
- Nadaraia-Hoke, S., Bann, D. V., Lochmann, T. L., Gudleski-O’Regan, N., and Parent, L. J. (2013). Alterations in the ma and nc domains modulate phosphoinositide-dependent plasma membrane localization of the rous sarcoma virus gag protein. *J. Virol.* 87, 3609–3615. doi: 10.1128/JVI.03059-12
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremontsov, D. N., Foti, M., and Thali, M. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biol.* 173, 795–807. doi: 10.1083/jcb.200508165
- O’Carroll, I. P., Soheilian, F., Kamata, A., Nagashima, K., and Rein, A. (2013). Elements in HIV-1 gag contributing to virus particle assembly. *Virus Res.* 171, 341–345. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.016
- Ono, A. (2009). HIV-1 assembly at the plasma membrane: gag trafficking and localization. *Future Virol.* 4, 241–257. doi: 10.2217/fvl.09.04
- Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K., and Freed, E. O. (2004a). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14889–14894. doi: 10.1073/pnas.0405596101
- Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K., and Freed, E. O. (2004b). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14889–14894. doi: 10.1073/pnas.0405596101
- Ono, A., and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13925–13930. doi: 10.1073/pnas.241320298
- Orenstein, J. M. (1998). The warthin-finkeldey-type giant cell in HIV infection, what is it? *Ultrastruct. Pathol.* 22, 293–303. doi: 10.3109/01913129809103350
- Orenstein, J. M., Meltzer, M. S., Phipps, T., and Gendelman, H. (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. *J. Virol.* 68, 2579–2586.
- Pelchen-Matthews, A. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162, 443–455. doi: 10.1083/jcb.200304008
- Perlman, M., and Resh, M. D. (2006). Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* 7, 731–745. doi: 10.1111/j.1398-9219.2006.00428.x
- Prchal, J., Srb, P., Hunter, E., Ruml, T., and Hrabal, R. (2012). The structure of myristoylated mason-pfizer monkey virus matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in its membrane binding. *J. Mol. Biol.* 423, 427–438. doi: 10.1016/j.jmb.2012.07.021
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., et al. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3, 718–729. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.31004.x

- Resh, M. D. (2005). Intracellular trafficking of HIV-1 gag: how gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev.* 7, 84–91.
- Saad, J. S., Ablan, S. D., Ghanam, R. H., Kim, A., Andrews, K., Nagashima, K., et al. (2008). Structure of the myristylated human immunodeficiency virus type 2 matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in membrane targeting. *J. Mol. Biol.* 382, 434–447. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.027
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11364–11369. doi: 10.1073/pnas.0602818103
- Samal, A. B., Ghanam, R. H., Fernandez, T. F., Monroe, E. B., and Saad, J. S. (2011). NMR, biophysical, and biochemical studies reveal the minimal calmodulin binding domain of the HIV-1 matrix protein. *J. Biol. Chem.* 286, 33533–33543. doi: 10.1074/jbc.M111.273623
- Schroeder, C. (2010). Cholesterol-binding viral proteins in virus entry and morphogenesis. *Subcell Biochem.* 51, 77–108. doi: 10.1007/978-90-481-8622-8_3
- Sharova, N., Swingler, C., Sharkey, M., and Stevenson, M. (2005). Macrophages archive hiv-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* 24, 2481–2489. doi: 10.1038/sj.emboj.7600707
- Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., et al. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 83, 3258–3267. doi: 10.1128/JVI.01796-08
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2005). Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 370–378. doi: 10.1016/j.conb.2005.05.005
- Tan, J., and Sattentau, Q. J. (2013). The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche? *Trends Microbiol.* 21, 1–8. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.001
- Taylor, J. E., Chow, J. Y. H., Jeffries, C. M., Kwan, A. H., Duff, A. P., Hamilton, W. A., et al. (2012). Calmodulin binds a highly extended HIV-1 ma protein that refolds upon its release. *Biophys. J.* 103, 541–549. doi: 10.1016/j.bpj.2012.06.042
- Thali, M. (2009). The roles of tetraspanins in HIV-1 replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 339, 85–102. doi: 10.1007/978-3-642-02175-6_5
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H. J., Amin, H., Willig, K. I., Hubrich, B. E., et al. (2011). Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature* 479, 552–555. doi: 10.1038/nature10545
- Vlach, J., Samal, A. B., and Saad, J. S. (2014). Solution structure of calmodulin bound to the binding domain of the HIV-1 matrix protein. *J. Biol. Chem.* 289, 8697–705. doi: 10.1074/jbc.M113.543694
- Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., and Kräusslich, H.-G. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog.* 3:e36. doi: 10.1371/journal.ppat.0030036
- Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell. Biol.* 19, 434–446. doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.004

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 19 March 2014; accepted: 08 June 2014; published online: 25 June 2014.

Citation: Mariani C, Desdouits M, Favard C, Benaroch P and Muriaux DM (2014) Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4⁺ T cells and macrophages. *Front. Microbiol.* 5:312. doi: 10.3389/fmicb.2014.00312

This article was submitted to *Virology*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2014 Mariani, Desdouits, Favard, Benaroch and Muriaux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 4 : Participations à des congrès - posters et présentations

Posters :

- Mariani-Floderer C., El Beheiry M., Dahan M., Sibarita J.B, Masson J.B, Favard C., Muriaux D., Dynamic nano-organization of HIV-1 Gag at the plasma membrane of in T-cells,
ICREA International Symposium - Mai 2016 - Barcelone
- Mariani-Floderer C., Favard C., Sibarita J.B, Muriaux D., HIV-1 Gag assembly dynamics in T-cells
Single Molecule Localization Microscopy Symposium - Août 2015 - Bordeaux
- Mariani-Floderer C., El Beheiry M., Dahan M., Favard C., Sibarita J.B, Muriaux D., HIV-1 Gag assembly dynamics in T-cells
Grisbi/Ipols - Juin 2015 - Montpellier
- Mariani C., El Beheiry M., Dahan M., Favard C., Sibarita J.B, Muriaux D., HIV-1 Gag assembly dynamics in T-cells
MiFoBio - Octobre 2014 - Seignosse
Prix de la meilleure communication par poster

Interventions :

- Animation d'un atelier avec C. Sieben lors du workshop: Assembly and budding of HIV-1 Gag in intact cells using sptPALM/TIRF microscopy.2 TP de 4h (2h pratique/2h analyse)
FBI-AT GDR France BioImaging - janvier 2016 - Montpellier
- Présentation orale : 20 min - présentation + questions, Dynamic nano-organization of HIV-1 Gag protein at the plasma membrane of CD4+ T cells,
Workshop GDR MIV - Molecule trajectories in Cellular Spaces - novembre 2015 - Lyon