



**HAL**  
open science

# Étude structurale de la protéine de capsid du virus de l'immunodéficience féline à des fins thérapeutiques

Mathieu Long

► **To cite this version:**

Mathieu Long. Étude structurale de la protéine de capsid du virus de l'immunodéficience féline à des fins thérapeutiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1164 . tel-03554740

**HAL Id: tel-03554740**

**<https://theses.hal.science/tel-03554740>**

Submitted on 3 Feb 2022

**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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1164

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**  
**(École doctorale interdisciplinaire sciences-santé)**

**Spécialité de doctorat : Biochimie Structurale**

Soutenue publiquement le 30/09/2021, par :

**Mathieu LONG**

---

# **Étude structurale de la protéine de capsid du virus de l'immunodéficience féline à des fins thérapeutiques**

---

Devant le jury composé de :

Miele, Adriana	Professeur des Universités UCBL	Présidente
Bernacchi, Serena	Directrice de Recherche CNRS	Rapporteuse
Tisné, Carine	Directrice de Recherche CNRS	Rapporteuse
Lescop, Ewen	Chargé de Recherche CNRS	Examineur
Rautureau, Gilles	Maître de Conférences ENS de Lyon	Examineur
Guillon, Christophe	Chargé de Recherche CNRS	Directeur de thèse



## **Université Claude Bernard – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine Faculté d'Odontologie	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux Faculté de Médecine Lyon-Est Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Doyenne : Mme Carole BURILLON Doyen : M. Gilles RODE Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



---

## **Étude structurale de la protéine de capsid du virus de l'immunodéficience féline à des fins thérapeutiques**

Le virus de l'immunodéficience féline (FIV) est un lentivirus, comme le VIH-1 qui infecte l'Homme. Le FIV infecte les félins domestiques et sauvages et représente un enjeu vétérinaire majeur car il cause un syndrome de type SIDA chez les animaux infectés. Aucun traitement efficace contre le FIV n'a été identifié à ce jour. La capsid du virus est une cible thérapeutique d'intérêt et une molécule ciblant la capsid du VIH-1 est en cours d'essai clinique. L'objectif de cette thèse est d'identifier des molécules interférant avec la capsid du FIV, par criblage et par identification rationnelle à l'aide de données structurales. La capsid est un assemblage d'oligomères de protéine de capsid p24. Un des aspects de ce travail est l'obtention d'hexamères stables de p24 FIV pour la résolution de la structure de cet assemblage. Par ailleurs, une autre approche par criblage a permis d'identifier une molécule interférant avec l'assemblage de la capsid. La première attribution de p24 FIV par résonance magnétique nucléaire a permis la caractérisation du site de fixation de ce composé, qui est homologue à celui identifié pour la molécule en cours d'essai clinique ciblant la capsid du VIH-1. Ce composé anti VIH-1 entrant en compétition avec des partenaires cellulaires indispensables à la réplication du VIH-1, nos résultats suggèrent que le composé identifié contre p24 FIV aurait une action similaire. Ainsi, ce composé est prometteur pour la mise au point de traitements efficaces contre le FIV.

## **Structural study of Feline Immunodeficiency Virus capsid protein for therapeutic purposes**

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a lentivirus, as HIV-1 infecting human beings. FIV infects both domestic and wild feline species and is a veterinary threat as it induces an AIDS-like syndrome in infected animals. To this day, no efficient treatment against FIV has been identified. The viral capsid is a therapeutic target of interest, and one drug binding the HIV-1 capsid is currently in clinical trials. The objective of this thesis is to identify molecules interfering with the FIV capsid through screening of existing compounds or rational drug design using structural data. The capsid is an assembly of oligomers of p24 capsid protein subunits. One of the aims of this work was the obtention of stable hexamers of FIV p24 to solve the structure of these oligomers. In the meantime, a screening identified one compound interfering with capsid assembly. The first attribution of FIV p24 through nuclear magnetic resonance allowed identifying the binding site of this molecule on FIV p24. This site is homologous to the binding site of the capsid-targeting drug in clinical trials. As that anti-HIV-1 compound competes with the bonding of cellular proteins necessary for HIV-1 replication, our results suggest our compound targeting FIV p24 could target a similar mechanism. Therefore, this compound is a promising drug for the development of efficient anti FIV drugs.

Mots-clefs : Virus de l'immunodéficience féline, cristallographie, résonance magnétique nucléaire, lentivirus, capsid, modélisation moléculaire, cible thérapeutique

Mots-clefs en anglais : Feline immunodeficiency virus ; crystallography ; nuclear magnetic resonance ; lentivirus ; capsid ; molecular modeling ; therapeutic target

---

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité de recherche Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB, UMR 5086) hébergée à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), dans l'équipe de recherche « Rétrovirus ». La thèse a été supervisée par le docteur Christophe Guillon. Cette thèse a été financée par le ministère de la Recherche, de l'Enseignement supérieur et de l'Innovation.

## Remerciements

---

Tout ce travail, toute cette aventure, n'aurait pas été possible sans plusieurs personnes, qui m'y ont amené, m'ont poussé à montrer que je pouvais le faire, qui m'ont tendu la main, qui m'ont apporté de la joie, m'ont réconforté quand ça n'allait pas. Des gens qui comptent désormais beaucoup pour moi parce qu'ils m'ont beaucoup donné, chacun à leur manière.

Les amis qui m'ont vu régulièrement et avec qui j'ai jusqu'à des heures indues, avec qui j'ai contribué à la santé économique des cinémas de Lyon, qui ont supporté mes créations de pâtisserie pas forcément toujours réussies. Vincent, avec qui nous avons refait le monde autour d'un angle de rue plus d'une fois, Vincent que j'ai pu appeler des heures et des heures quand ça n'allait pas. Paul, Victor et Emma, dont l'appartement est devenu plus ou moins notre deuxième lieu de vie, et l'un des points de réunion majeurs de notre vie sociale, toujours prêts à organiser des sorties. Nono et Félix, dont l'appartement a eu un rôle très similaire, et que j'admire pour leurs capacités à mener de front aussi bien leur vie professionnelle et personnelle de manière aussi remplie et passionnée. Théo, Estelle, Nathalie, et Tristan qui ont vu déferler par moment des messages inarrêtables parfois en rapport avec la science, avec le travail, généralement sur des brouilles. Des gens qui m'ont entraîné avec eux pour des vacances, qui m'ont donné beaucoup, depuis des années maintenant. Merci. Merci tout particulièrement à Yann et Noémie qui m'aviez poussé un jour en M1 à aller discuter d'un stage avec Patrice. Finalement, c'est un peu grâce à vous que j'ai contacté Patrice pour envisager cette thèse.

Léa, Cecilia et Margaux pour des moments passionnés dans le fameux bureau des thésards, où l'ambiance a beaucoup évolué au fur et à mesure de l'avancée de la thèse et que le temps passait. Merci bien sûr également aux autres étudiants et stagiaires qui se sont succédé, Hollie et Coralie, Chloé et Johan ; merci à Vinesh Minh Chau, Camille, pour toutes ces discussions autour d'une tasse de café ou autour d'un gel de protéine, merci à Xavier, Francesca, Lionel, Sébastien, Frédéric, Nushin. Merci à vous, Patrice et Christophe, pour votre savoir, votre aide et m'avoir accueilli dans l'équipe et pour le soutien pendant un peu plus de ces 3 années.

Les utilisateurs du foyer de l'ENS. Lieu de vie et de sociabilisation absolument génial, où l'on s'assoit à 18h et de fil en aiguille, on y reste jusqu'à 2h du matin voir davantage sans même avoir compris ce qui s'est passé, si ce n'est qu'on y a passé un bon moment. On y joue aux cartes, on y regarde des nanards, on refait le monde, on rejoue aux cartes, on discute autour d'une bière. On y fait des rencontres sans même avoir besoin de demander le nom des gens, simplement en parlant d'un sujet quelconque et ceux qui veulent intervenir rejoignent puis quittent la conversation. On peut y parler de sciences parfois aussi, mais ça restreint les intervenants dans la conversation, et pour inclure des gens on se remet à jouer aux cartes, et quand on a le temps et la détermination, au Zombicide ou on regarde des comédies musicales de qualité (prévoir à nouveau 3h dans tous les cas). Janelle, Clément, Corentin, Marine et Marine, Alexandre et Alexandre, Adrien et Hadrien,

Yohann, Laureline, Elodie, Henry, Valentine, ceux à qui je n'ai même pas demandé leurs noms, et ceux que j'oublie. Et je remercie tout particulièrement Simon F. pour tu-sais-quoi, qui a été extrêmement utile !

Les enseignants et chercheurs qui m'ont téléphoné, pris de mes nouvelles, conseillés ; Nathalie A., Gilles, Chloé, Lauriane, sachez que votre aide et votre soutien ont été grandement appréciés et m'ont aidé à avancer encore et encore.

Sans oublier la famille, qui m'a soutenue énormément. Maman, pour toutes les fois où tu m'as ramassé à la petite cuillère au téléphone mais en trouvant toujours les mots pour me relancer. Mamie, pour tout ton soutien aussi à chaque coup de fil, pour paraître aussi émerveillée devant ce que je fais, même quand ça n'a rien de fantastique. Papa, Christiane et Jules, pour me sortir de ma bulle et ces après-midis autour d'un repas et d'un film. Augustin, pour les conseils que tu m'as donnés pour affronter les études et la thèse. À toute ma famille, merci pour tout votre soutien qui m'a toujours fait très chaud au cœur.

Enfin, je remercie C.C., C.C., C.C., C.D., W.D., D.L., L.D., L.G, J.J.G., J.D.G., J.G. et F.G. pour leurs productions audiovisuelles inestimables qui ont été une grande source de détente, d'amusement ou d'inspiration.

À vous tous, merci. Rien n'aurait été possible sans vous tous.

## Table des matières

---

Remerciements .....	7
Table des matières .....	9
I. Introduction .....	15
A. Identification du virus de l'immunodéficience féline .....	15
B. Les rétrovirus.....	15
1. Classification systématique du FIV .....	15
2. Structure et organisation génétique des rétrovirus .....	16
3. Les lentivirus .....	17
4. Les pathologies induites par les rétrovirus.....	19
5. Les modes de transmission des rétrovirus.....	19
6. La productivité de l'infection en fonction du cycle cellulaire .....	20
C. Co-évolution entre le FIV et ses hôtes .....	20
D. Le cycle viral du FIV .....	22
1. Processus du cycle viral .....	22
2. Infection de la cellule .....	23
3. Le rôle de la capsid e dans le transport du génome.....	24
4. Formation du complexe de pré-intégration.....	24
5. Régulation de l'expression des protéines virales précoces et tardives...	26
6. Expression et assemblage des protéines structurales et formation des virions.....	26
E. La polyprotéine Gag des lentivirus.....	27
F. La capsid e des lentivirus .....	33
G. Les partenaires cellulaires de la capsid e.....	38
1. Les facteurs de restriction ciblant la capsid e.....	38
2. Les protéines nécessaires au cycle viral.....	39
H. Le désassemblage de la capsid e .....	41
I. La capsid e comme cible thérapeutique .....	43
J. Essais de traitements pour les infections à FIV .....	47
K. Développements de composés antiviraux <i>via</i> les approches structurales ..	48
L. État des lieux sur la caractérisation de la protéine de capsid e du VIH-1 ....	50
M. Objectif de la thèse.....	51

---

---

II.	Résultats.....	53
A.	Essais de résolution de structure par une approche cristallographique.....	53
1.	Structure connue de la protéine de capsid p24 FIV.....	53
2.	Cristallogenèse d'hexamères de FIV p24 $\Delta$ CPT natifs.....	54
3.	Formation de ponts disulfures pour la stabilisation de la capsid.....	60
4.	Optimisation de la formation des ponts disulfures.....	70
B.	Identification de ligands et caractérisation par la RMN.....	79
1.	Attribution RMN de la protéine de capsid.....	79
2.	Identification de composés interférant avec la capsid du FIV.....	93
3.	Caractérisation du potentiel thérapeutique du ligand <b>696</b> .....	103
4.	Analyse de la fixation des peptides cellulaires ciblant les hélices $\alpha 3$ , $\alpha 4$ et $\alpha 7$ .....	105
III.	Discussion.....	111
A.	Impossibilité de la modélisation de l'assemblage hexamérique.....	112
B.	La protéine FIV p24 présente une dynamique intrinsèque.....	115
C.	Essais de stabilisation des hexamères de FIV p24 <i>via</i> les ponts disulfures.....	118
D.	La partie C-terminale de FIV p24 semble nécessaire à l'assemblage <i>in vitro</i> .....	121
E.	Les antiviraux ciblant VIH-1 p24 stabilisent les hexamères.....	123
F.	Mise en évidence du composé <b>696</b> ciblant la protéine de capsid du FIV.....	124
G.	Hypothèse d'un mécanisme d'inhibition commun aux lentivirus.....	127
H.	Ciblage de l'interaction avec les partenaires cellulaires.....	129
I.	Nécessité d'une optimisation de <b>696</b> .....	132
J.	Affinement de la caractérisation de l'interaction de <b>696</b> avec la capsid du FIV.....	133
IV.	Conclusion et perspectives.....	135
V.	Matériels et méthodes.....	139
A.	Clonage des gènes sauvages et mutants de FIV p24.....	139
1.	Transformation des bactéries.....	139
2.	Amplification d'ADN – minipréparation.....	139
3.	Électrophorèse, révélation et analyse des fragments d'ADN.....	140
4.	Description des plasmides et de leur construction.....	140
B.	Expression des protéines.....	148
1.	Production de protéine non marquée.....	148
2.	Production de protéine pour les expériences de RMN.....	149

---

C.	Purification de la protéine.....	151
1.	Lyse des culots bactériens.....	151
2.	Purification en batch.....	151
3.	Purification en chromatographie FPLC.....	152
D.	Clivage de l'étiquette au facteur Xa et purification.....	153
E.	Séparation des protéines sur SDS-PAGE.....	154
F.	Immunodétection sur membrane de la protéine p24E A41C/T53C/C61S.....	155
G.	Test de dimérisation de la protéine p24 $\Delta$ CPT.....	155
H.	Formation des ponts disulfures par incubation et analyse.....	156
1.	Formation des ponts disulfures.....	156
2.	Détermination des ponts disulfures par la spectrométrie de masse.....	157
I.	Criblage et caractérisation des ligands ciblant p24.....	158
1.	Préparation des ligands.....	158
2.	Expériences de biophysique sur la protéine et ses ligands.....	158
3.	Analyse de l'action du ligand sur l'assemblage <i>in vitro</i> .....	161
J.	Cristallographie.....	162
1.	Cristallogénèse en micropuits.....	162
2.	Cristallogénèse en gouttes suspendues.....	163
3.	Préparation des cristaux et acquisition des données de diffraction.....	163
K.	Acquisition et traitements des spectres RMN.....	164
1.	La résonance magnétique nucléaire appliquée aux protéines.....	164
2.	Le processus d'attribution séquentielle des pics.....	164
3.	Acquisition des spectres.....	166
4.	Suivi des perturbations des déplacements chimiques induits par l'ajout de ligand.....	167
L.	Logiciels de visualisation et d'analyse des structures.....	168
M.	Modélisation moléculaire.....	168
VI.	Bibliographie.....	171
VII.	Publications.....	193



Abréviations

---

- BEST-TROSY : *Band-selective Excitation Short-Transient TROSY*
- BS<sup>3</sup> : bis(sulfosuccinimidyl)suberate
- CA : protéine de capside
- CAEV : *Caprine Arthritis Encephalitis Virus*
- CPSF6 : *Cleavage and polyadenylation specific factor subunit 6*
- cryoEM : cryo-microscopie électronique
- CsA : cyclosporine A
- CTD, NTD : domaine C-terminal / domaine N-terminal
- CypA : cyclophiline A
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- EIAV : *Equine Infectious Anemious Virus*
- ESCRT : *Endosomal sorting complex required for transport*
- FeLV : virus de la leucémie féline
- FIV : virus de l'immunodéficience féline
- FPLC : chromatographie liquide rapide de protéines
- HSQC : *Hetero Single Quantum Correlation*
- HTLV : *Human T-lymphotropic Virus*
- ICTV : *International Committee for Taxonomy of Virus*
- IMAC : chromatographie d'affinité pour le métal immobilisé
- IN : intégrase
- IP<sub>6</sub> : inositol hexakisphosphate
- IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
- ITC : titration calorimétrique isotherme
- LEDGF : *lens epithelium-derived growth factor*
- MA : protéine de matrice
- MVV : *Maedi-Visna Virus*
- NC : protéine de nucléocapside
- NOE/NOESY : *Nuclear Overhauser Effect / Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
- PIC : complexe de pré-intégration
- PR : protéase
- RELIK : *Rabbit endogenous lentivirus K*
- RMSD : *root-mean square difference*
- RT : transcriptase inverse
- SIV : virus de l'immunodéficience simienne
- STD : *Saturation Transfer Difference*
- TROSY : *Transverse relaxation-optimized spectroscopy*
- VIH-1, VIH-2 : virus de l'immunodéficience humaine type 1, type 2



## I. Introduction

---

### A. Identification du virus de l'immunodéficience féline

Le virus de l'immunodéficience féline, *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV), a été caractérisé pour la première fois en 1987 chez des chats d'un refuge animalier de Petaluma en Californie (Pedersen *et al.*, 1987). Ces chats présentaient une immunodéficience qui les rendaient sensibles à des infections opportunistes (Hartmann, 2012 ; Hoffmann-Fezer *et al.*, 1992 ; Novotney *et al.*, 1990) mais ils étaient négatifs aux virus déjà connus comme le virus FeLV qui induit une immunodéficience (Hartmann, 2011 ; Koshy, Gallo et Wong-Staal, 1980). Les prélèvements et analyses des virus de ces chats ont mis en évidence un nouveau rétrovirus, le virus FIV, qui appartient au genre des lentivirus dont fait également partie le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Le FIV a alors été recherché à plus grande échelle et il a été identifié sur l'ensemble de la planète, où il infecte les espèces félines domestiques et sauvages. Il est estimé que le virus est originaire d'Afrique et qu'il se serait répandu sur l'ensemble des autres continents il y a plusieurs millions d'années, en suivant les migrations des espèces félines (Johnson *et al.*, 2006 ; Pecon-Slattey *et al.*, 2008). En conséquence, le virus est aujourd'hui endémique sur l'ensemble de la planète. Par exemple, il est estimé qu'environ 5 à 10 % des chats, domestiques et sauvages et entre 20 % et 100 % des lions, sont infectés dans le monde, avec de fortes variabilités selon les territoires (Brown *et al.*, 2010 ; Little, 2011 ; Roelke *et al.*, 2009 ; Szilasi *et al.*, 2019).

### B. Les rétrovirus

#### 1. Classification systématique du FIV

Selon la classification du comité international de taxonomie des virus (*International Committee for Taxonomy of Virus*, ICTV (Lefkowitz *et al.*, 2018)), le FIV appartient à la famille des *Retroviridae* ou rétrovirus. Cette famille se divise en deux sous-familles, les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae* ou spumavirus. Les spumavirus ne sont pas associés à des pathologies connues. La sous-famille des *Orthoretrovirinae* se divise en plusieurs genres contenant chacun plusieurs espèces, avec pour chaque genre une espèce représentatrice du genre, correspondant à la mieux étudiée. Le FIV appartient à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*, genre *Lentivirus*, dont l'espèce représentatrice est le VIH-1 (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des membres des rétrovirus. Chaque genre regroupe plusieurs espèces dont une espèce représentative du genre, la mieux étudiée. La pathologie induite par l'espèce représentative est indiquée. D'après la classification de l'ITCV (Lefkowitz et al., 2018).

Sous-famille	Genre	Espèce principalement décrite	Pathologies induites par le représentant du genre
<b>Orthoretrovirinae</b>	<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Avian leukosis virus</i> (ALV)	Lymphome, sarcome
	<i>Betaretrovirus</i>	<i>Mouse mammary tumor virus</i> (MMTV)	Carcinome
	<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Bovine leukemia virus</i> (BLV)	Leucémie
	<i>Epsilonretrovirus</i>	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>	Sarcome
	<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Murine leukemia virus</i> (MLV ou MuLV)	Leucémie
	<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency virus 1</i> (VIH-1)	Immunodéficience acquise
<b>Spumaretrovirinae</b>	<i>Bovispumavirus</i>	<i>Bovine foamy virus</i> (BFV)	Pas de pathologies décrites
	<i>Equispumavirus</i>	<i>Equine foamy virus</i> (EFV)	
	<i>Felispumavirus</i>	<i>Feline foamy virus</i> (FFV)	
	<i>Prosimiispumavirus</i>	<i>Brown greater galago prosimian foamy virus</i>	
	<i>Simiispumavirus</i>	<i>Eastern chimpanzee simian foamy virus</i>	

## 2. Structure et organisation génétique des rétrovirus

Les rétrovirus sont caractérisés par l'étape de transcription inverse au cours de leur cycle viral. Leur génome est présent sous forme de dimère d'ARN (ARN génomique, ARNg) au sein des virions, puis est rétrotranscrit en ADN double brin (ADNdb) par une enzyme virale dans la cellule néo-infectée. Cet ADNdb est intégré dans le génome cellulaire, ce qui permet l'expression des gènes viraux et la réplication du génome viral par transcription par la machinerie cellulaire.

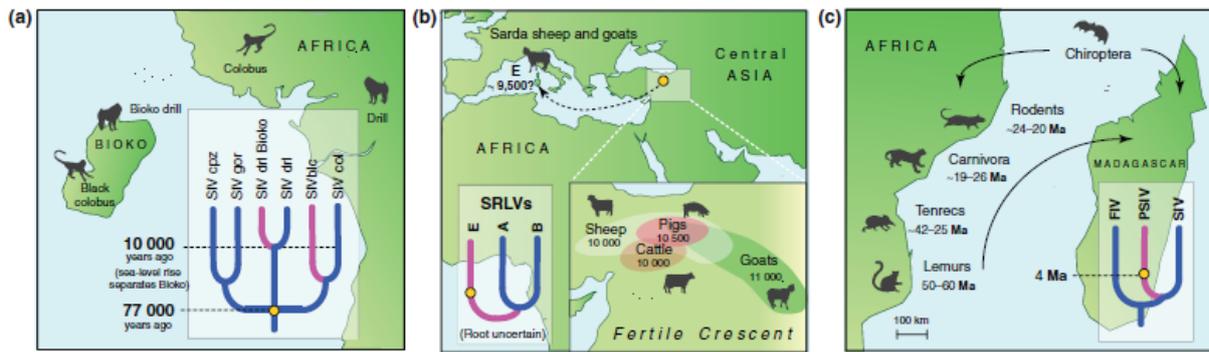
Tous les rétrovirus contiennent les gènes canoniques *gag*, *pol* et *env*. Les gènes *gag* et *env* codent des protéines structurales tandis que le gène *pol* code des enzymes nécessaires à la rétrotranscription, l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire et la maturation des virions. Chacun de ces gènes code des polyprotéines à plusieurs sous-unités, qui sont séparées par clivage protéolytique au cours de la morphogenèse du virus et de sa maturation. Les rétrovirus ne possédant que ces 3 gènes canoniques sont appelés rétrovirus simples. Les rétrovirus complexes possèdent des gènes supplémentaires, qui codent des

protéines de régulation et d'interférence avec les protéines cellulaires. Le génome du VIH-1 contient ainsi des protéines accessoires, comme des protéines impliquées dans l'échappement à la réponse immunitaire intrinsèque, comme Vpu (Seissler, Marquet et Paillart, 2017), ou dans la régulation de la transcription comme Tat, par exemple (Spector *et al.*, 2019). Le FIV est également un rétrovirus complexe. Son génome contient des gènes supplémentaires codant des protéines comme Orf-A possédant plusieurs actions similaires à celles des protéines VIH-1 Tat, Vpu, Vpr et Nef (Gemeniano *et al.*, 2003 ; Parseval et Elder, 1999 ; Troyer *et al.*, 2013). La protéine Orf-A réalise de multiples fonctions utiles à la progression du cycle viral dans la cellule infectée, comme la régulation de l'expression des gènes viraux (Parseval et Elder, 1999) ou l'arrêt du cycle cellulaire, permissif à la multiplication virale (Gemeniano, Sawai et Sparger, 2004).

### 3. Les lentivirus

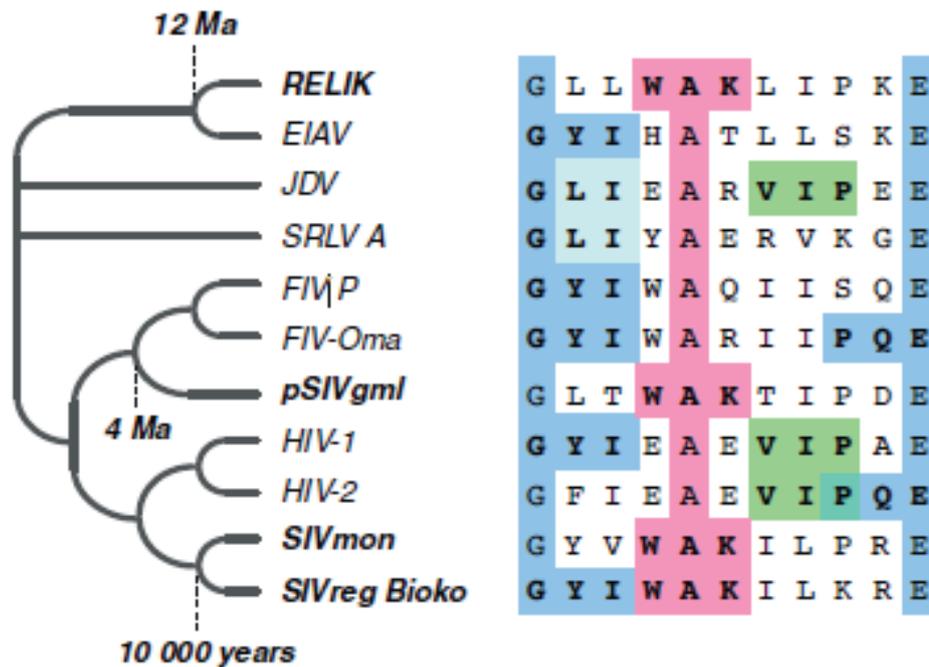
La caractéristique des lentivirus est une évolution lente de la pathologie (Haase, 1986). Le développement du SIDA après l'infection au VIH-1 se fait en moyenne en 10 ans (Vergis et Mellors, 2000). Pour le FIV, l'immunodéficience acquise apparaît en moyenne 2 ans après l'infection chez le chat domestique (Bęczkowski *et al.*, 2015) et plus de 4 ans chez le lion (Roelke *et al.*, 2009). Le genre des lentivirus contient de nombreuses espèces, adaptées à un hôte animal spécifique (Sharp et Hahn, 2011). Les études génétiques permettent d'établir les arbres phylogénétiques de ces différentes espèces et de retracer l'évolution des différents lentivirus au cours du temps, les franchissements d'espèces hôtes et leur propagation dans le monde (Figure 1 (Gifford, 2012)).

La phylogénie de la Figure 1 a pu être établie en étudiant les séquences des gènes. Différentes classifications peuvent être établies en fonction de ce que l'on compare. L'étude de Gifford propose ainsi plusieurs classifications en regardant soit l'ensemble des gènes, soit une protéine spécifique, soit les protéines des gènes canoniques *gag*, *pol* et *env* (Gifford, 2012). La Figure 2 présente une phylogénie basée sur l'alignement des séquences de l'intégrase pour différents lentivirus, dont le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV), le lentivirus endogène K du lapin (RELK), le virus de la maladie de Jembrana (JDV) infectant les bovins, les virus de l'immunodéficience féline (FIV), humaine (VIH-1 et VIH-2) et simienne (SIV) et les virus des petits ruminants (SRLV), ensemble comprenant les virus *Maedi-Visna Virus* (MVV) et *Caprine Arthritis Encephalitis Virus* (CAEV).



TRENDS in Genetics

Figure 1 : Phylogénie et géographie de l'évolution des lentivirus. Les arbres phylogénétiques indiquent la divergence des espèces et des types viraux et les dates estimées de divergence (en bleu : lien phylogénétique attesté, en rose, lien incertain). (a) Distribution des types de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) entre l'Afrique continentale et l'île de Bioko. (b) Évolution des lentivirus de petits ruminants (*Small Ruminant Lentiviruses*, SRLV). La flèche indique l'étape suspectée de propagation des SRLV et de l'évolution des génotypes A, B et E. (c) évolution de la branche du SIV, des virus de l'immunodéficience des prosimiens (PSIV) et du virus de l'immunodéficience féline. Les flèches indiquent les mouvements d'espèces animales ayant pu se propager entre les territoires les différentes espèces virales. D'après (Gifford, 2012).



TRENDS in Genetics

Figure 2 : Phylogénie des lentivirus basée sur l'alignement de séquences de l'intégrase des virus étudiés. RELIK : *rabbit endogenous lentivirus K*, lentivirus endogène K du lapin ; pSIV et SIV : virus de l'immunodéficience protosimienne et simienne ; SRLV : *Small Ruminants Lentivirus* ; JDV : virus de la maladie de Jembrana. Les acides aminés d'un même code couleur de surlignage correspondent à une séquence de trois acides aminés partagée. D'après (Gifford, 2012).

#### 4. Les pathologies induites par les rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus infectant certains animaux, dont l'Homme. Les membres de la famille des *Orthoretrovirinae* induisent des pathologies chez les organismes infectés (Knipe et Howley, 2013). On retrouve ainsi des formes de cancers chez certains animaux. Par exemple, le *Rous Sarcoma Virus* (RSV) est responsables de cancers chez le poulet (Rubin, 2011), le virus *Avian leukosis virus* chez les oiseaux et le *Human T-lymphotropic virus* (HTLV) chez l'Homme (Bangham et Ratner, 2015 ; Matsuoka, 2005). Certains virus induisent une immunodéficience comme le VIH-1 chez l'Homme (Barré-Sinoussi, 1996) ou le FIV chez les espèces félines (Pedersen *et al.*, 1987) (Tableau 1).

Certains rétrovirus ne sont pas ou ne sont que peu symptomatiques et n'engendrent pas de pathologies. Les Spumavirus n'en induisent pas, et certains rétrovirus ne déterminent une pathologie que seulement chez une partie des populations infectées comme le *Human T-cell Leukemia Virus-1* (HTLV-1), qui induit une leucémie chez 2 à 4 % des patients infectés ou une myélopathie chez 1 à 2 % des infectés (Futsch, Mahieux et Dutartre, 2018).

Par ailleurs, au sein d'un même genre, les différentes espèces n'induisent pas nécessairement les mêmes pathologies chez l'hôte infecté. Parmi les lentivirus, le VIH-1, le VIH-2, le *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV), le *Bovine Immunodeficiency Virus* (BIV) et le FIV induisent des immunodéficiences. Les autres lentivirus déterminent d'autres types de pathologies, comme *Maedi-Visna Virus* (MVV) ou *Caprine arthritis-encephalitis Virus* (CAEV). Ces virus induisent des maladies inflammatoires touchant les poumons ou les articulations et sont liés à des pathologies respiratoires ou des arthrites ; chacun de ces deux virus sont susceptibles d'induire ces deux types de pathologies, même si MVV cause majoritairement une pathologie des poumons et CAEV des articulations (Gomez-Lucia, Barquero et Domenech, 2018). Enfin, *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV) induit une anémie et une thrombocytopénie (Leroux, Cadoré et Montelaro, 2004).

Si les infections aux spumavirus sont peu symptomatiques et n'engendrent pas de pathologies (Knipe et Howley, 2013 ; Linial, 2000 ; Murray et Linial, 2019 ; Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000), il est décrit que les co-infections par les spumavirus et d'autres rétrovirus peuvent aggraver les pathologies engendrées par ces autres rétrovirus. Cela a été décrit chez les chimpanzés co-infectés par le *Simian immunodeficiency virus* et le *Simian foamy virus*, et le même processus de potentialisation des infections est suspecté chez le chat au cours d'une co-infection entre *Feline foamy virus* et FIV ou FeLV (Cavalcante *et al.*, 2018).

#### 5. Les modes de transmission des rétrovirus

La transmission des rétrovirus se fait *via* le sang, les fluides sexuels, les fluides nasopharyngés, ou de la mère à l'enfant au cours de la grossesse ou par l'allaitement (Scott *et al.*, 2008 ; Troyer *et al.*, 2008). Dans le cas du FIV, le mode de transmission majoritaire semble être davantage les infections intramusculaires ou par échanges de sang, résultant très probablement de combats entre individus

(Litster, 2014 ; Miller *et al.*, 2017) plutôt que par transmissions sexuelles ou verticales de la mère aux chatons (Rogers et Hoover, 1998 ; Sellon *et al.*, 1994).

## 6. La productivité de l'infection en fonction du cycle cellulaire

Les rétrovirus intègrent leur génome au sein du génome cellulaire, situé à l'intérieur du noyau. Il se pose donc le problème de l'import du génome viral dans le noyau. Certains rétrovirus ne peuvent ainsi réaliser une infection productive que dans des cellules en cours de division cellulaire. Au cours de cette dernière, le noyau est désassemblé temporairement, ce qui rend accessibles les chromosomes cellulaires pour l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire (Roe *et al.*, 1993).

L'import nucléaire du génome viral des lentivirus ne requiert pas le désassemblage du noyau (Naldini, 1998). Cet import est réalisé par des mécanismes spécifiques permettant l'import dans le noyau. Cependant, les lentivirus ne sont pas complètement indépendants du cycle cellulaire pour la réalisation du cycle viral, notamment lors de la phase de la rétrotranscription ; le VIH-1 requiert l'inhibition de certaines protéines cellulaires par l'entrée en phase G1 des macrophages infectés (Ferreira *et al.*, 2020) et des lymphocytes T CD4 (Roux *et al.*, 2019). D'autres lentivirus expriment des protéines inhibant la restriction cellulaire à l'infection, comme la protéine Vpx pour VIH-2 (Bakir, 2018). La dépendance de la progression dans le cycle cellulaire pour l'infection virale apparaît donc comme spécifique à chaque virus, selon des interactions hôtes/pathogènes précises. À notre connaissance, la dépendance du FIV au cycle cellulaire pour l'infection n'a pas été décrite.

## C. Co-évolution entre le FIV et ses hôtes

On distingue parmi l'ensemble de l'espèce FIV, des types apparentés distincts qui circulent parmi les différents hôtes. Le virus infecte ainsi le puma, le lynx, les chats domestiques et sauvages, le lion et la panthère (Pecon-Slattery *et al.*, 2008). La Figure 3 présente un arbre phylogénétique des types et sous-types du FIV.

Les souches sont adaptées à leur hôte mais restent transmissibles entre espèces, avec quelques cas de transmission d'une souche (FIVpcoA) passant du puma au lynx (Franklin *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2017). Les souches circulant chez le lynx et le puma sont capables d'infecter le chat domestique (VandeWoude, Troyer et Poss, 2010). Les analyses génétiques ont permis de reconstruire les lignées évolutives des différentes souches de FIV et de montrer une co-évolution du FIV avec les espèces félines mais également des événements de franchissement d'espèces anciens et récents (Figure 4).

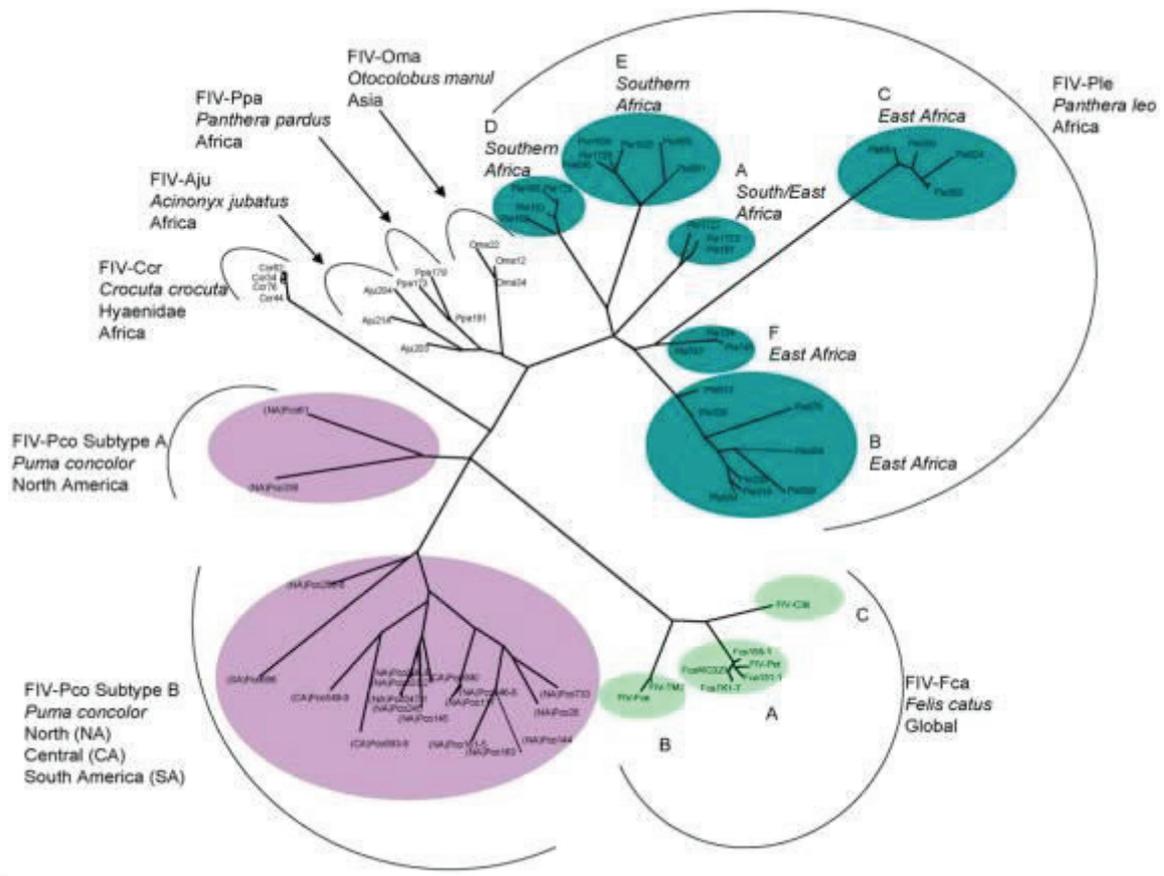


Figure 3 : Phylogénie des types et sous-types du virus de l'immunodéficience féline identifiés parmi des espèces domestiques et sauvages (basée sur le gène *pol-RT*). Les différentes souches présentant un tropisme pour certaines espèces félines peuvent être classées en plusieurs familles, avec différents sous-types au sein de ces familles. L'échelle indique le nombre de substitutions par site. Les souches entourées d'une même couleur infectent la même espèce hôte. L'arbre phylogénétique a été obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance (Pecon-Slattey *et al.*, 2008).

Si le FIV est adapté à ses hôtes félines, les transmissions vers l'Homme n'ont jamais été observées. Les facteurs de restriction antiviraux humains sont efficaces contre le FIV (Zhang *et al.*, 2018) et, réciproquement, les facteurs antiviraux félines restreignent les infections de ces espèces par le VIH-1 ou le SIV (Zhang *et al.*, 2016).

Enfin, au sein même d'une espèce hôte, les souches circulantes diffèrent. Le FIV possède plusieurs types et sous-types qui n'ont pas une distribution homogène sur l'ensemble de la planète (Westman *et al.*, 2016). En fonction des territoires étudiés, les prévalences des infections dans la population présentent de fortes variations, de 1 à 44 % (Bęczkowski *et al.*, 2015).

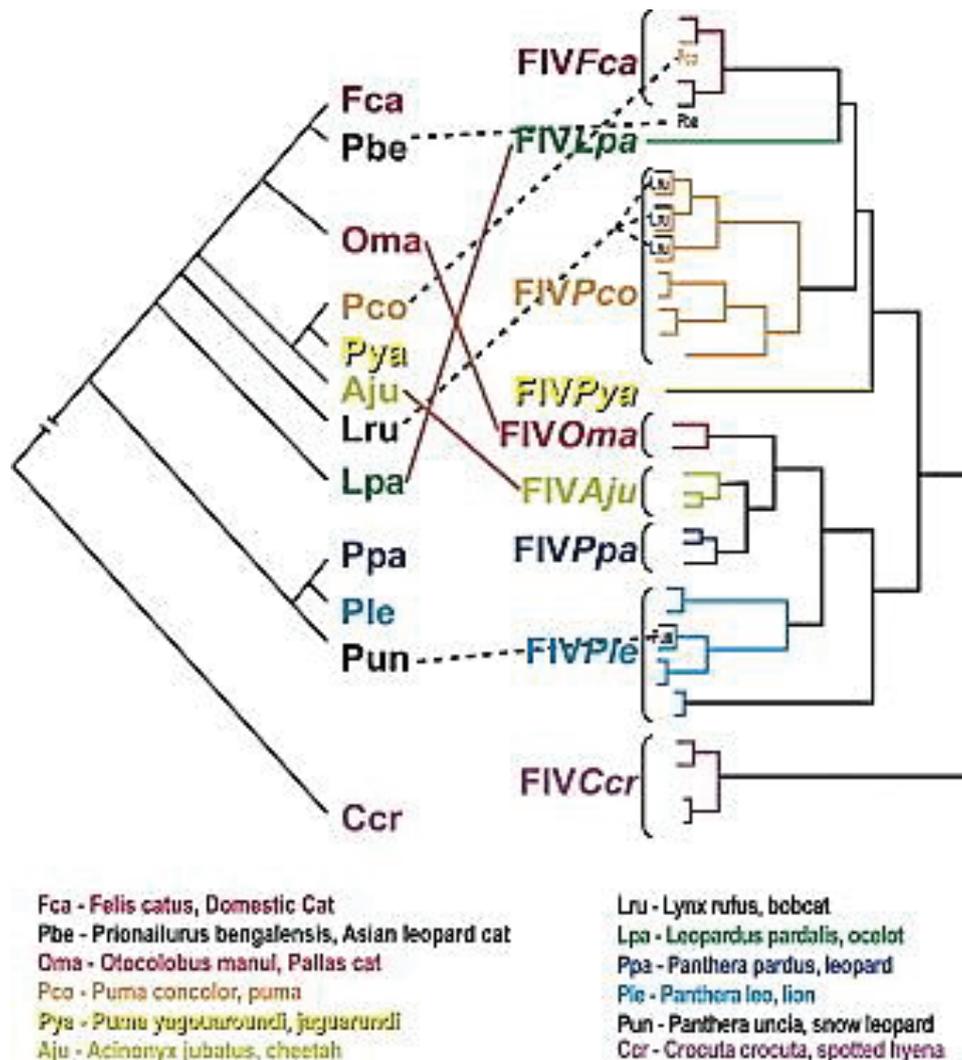


Figure 4 : Co-évolution des souches de FIV et des espèces infectées. Les couleurs identiques indiquent les correspondances entre une espèce féline et la souche virale circulant majoritairement au sein de l'espèce féline. La majorité des embranchements phylogénétiques montre une correspondance entre l'évolution des espèces félines et celle des souches virales, mais les arbres ne sont pas rigoureusement parallèles et des sauts d'espèces ont eu lieu. Les lignes rouges indiquent des événements anciens de sauts d'espèces qui ne respectent pas cette concordance phylogénétique, et les lignes noires en pointillés les infections possibles par saut d'espèces. (Troyer *et al.*, 2008).

## D. Le cycle viral du FIV

### 1. Processus du cycle viral

Le FIV, comme les autres rétrovirus, est un virus enveloppé, portant des protéines d'enveloppe dans la membrane virale. Le virion contient des structures supramoléculaires contenant le génome viral. Le cycle viral du FIV est initié par l'interaction entre ces protéines d'enveloppe et les récepteurs cellulaires, permettant la fusion du virus avec la cellule cible (voir la section suivante pour plus de détails). Les structures supramoléculaires sont alors libérées à l'intérieur de la cellule. Le génome viral est rétrotranscrit en ADNdb, qui s'intègre ensuite dans le

génomique cellulaire, ce qui permet d'exprimer les gènes viraux, aboutissant à la formation des protéines virales et la formation des nouveaux virions (Figure 5).

Le cycle cellulaire chez le FIV reste cependant mal décrit. Le cycle viral du VIH-1, virus modèle du genre des lentivirus, sert donc de référence pour essayer de mieux comprendre le FIV, son cycle cellulaire et ses partenaires cellulaires nécessaires à la multiplication du virus. Dans la suite de cette partie, les informations vérifiées sur le FIV seront indiquées, et les informations plus générales sur le VIH-1 seront supposées comme pouvant être transposables au FIV.

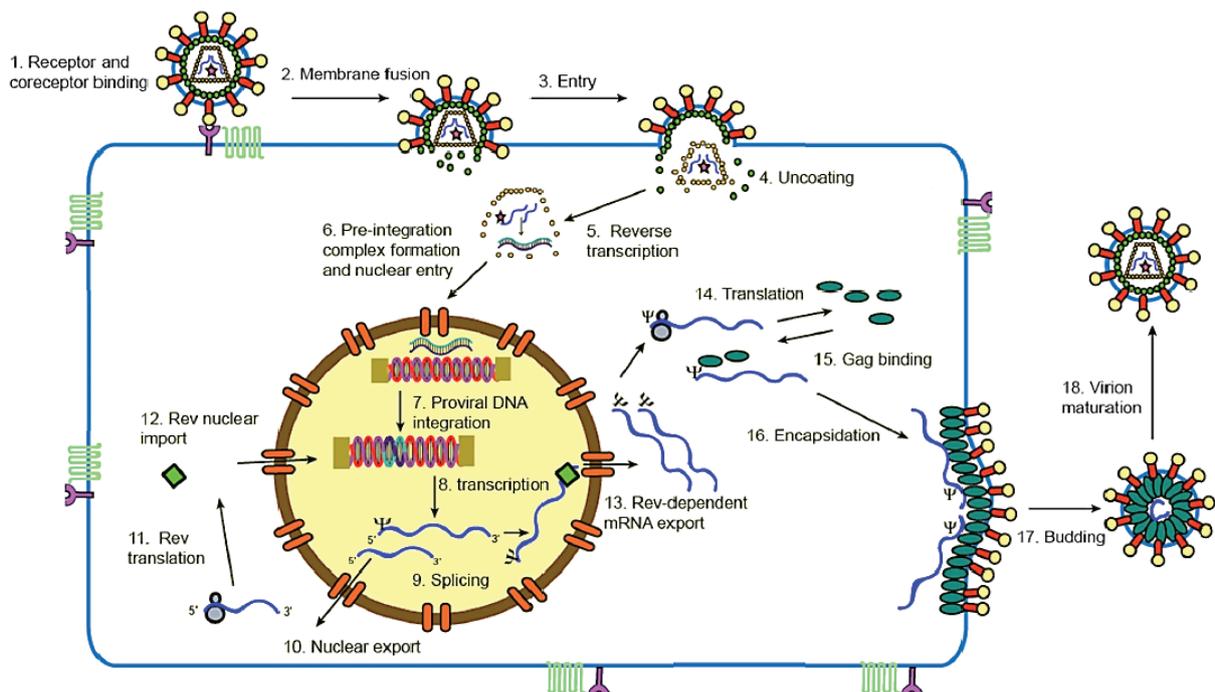


Figure 5 : Cycle viral du FIV (Kenyon et Lever, 2011). Après interaction avec le récepteur CD134, la membrane virale fusionne avec la membrane plasmique et la capsid virale pénètre dans la cellule. La transcription inverse a lieu post-infection et l'ADN double brin viral est intégré au sein du génome cellulaire, ce qui permet l'expression des protéines virales. Les protéines précoces permettent la régulation de l'expression des protéines tardives, par exemple la protéine Gag, et l'export des ARNg qui seront incorporés dans les virions en formation.

## 2. Infection de la cellule

L'infection d'une cellule initie le cycle viral jusqu'à la libération de nouveaux virions hors de la cellule. Les glycoprotéines d'enveloppe des souches du FIV infectant le chat interagissent avec les récepteurs cellulaires félins CD134 et CXCR4 (Kenyon et Lever, 2011 ; Richardson *et al.*, 1999 ; Shimojima *et al.*, 2004). Lors de l'interaction entre les glycoprotéines virales d'enveloppe et les récepteurs cellulaires, les réarrangements structuraux des glycoprotéines mènent à la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique et ainsi l'entrée du matériel viral dans le cytosol.

Cependant, on observe une variabilité sur le récepteur utilisé en fonction du type viral et de l'espèce infectée : en effet les récepteurs utilisés par les virus circulant chez le lion et le puma sont encore inconnus mais CD134 n'est pas impliqué (Troyer *et al.*, 2008). Cependant, les récepteurs utilisés par le virus et leur expression dans des types cellulaires spécifiques déterminent le tropisme cellulaire du virus, ce qui correspond, dans le cas du FIV, aux lymphocytes T CD 4 (Shimojima *et al.*, 2004) et aux cellules placentaires (Scott *et al.*, 2008).

### 3. Le rôle de la capside dans le transport du génome

Le génome viral est protégé au sein d'un assemblage supramoléculaire, la capside. La capside limite les diffusions entre l'intérieur et l'extérieur ; le génome viral est contenu à l'intérieur et les protéines cellulaires ne rentrent pas dans la capside, mais les petites molécules comme les désoxynucléotides cellulaires peuvent le faire et permettre ainsi la rétrotranscription du génome en ADNdb (Jacques *et al.*, 2016). Enfin, la décapsidation est requise pour la réalisation complète du cycle viral et pour la libération du génome viral.

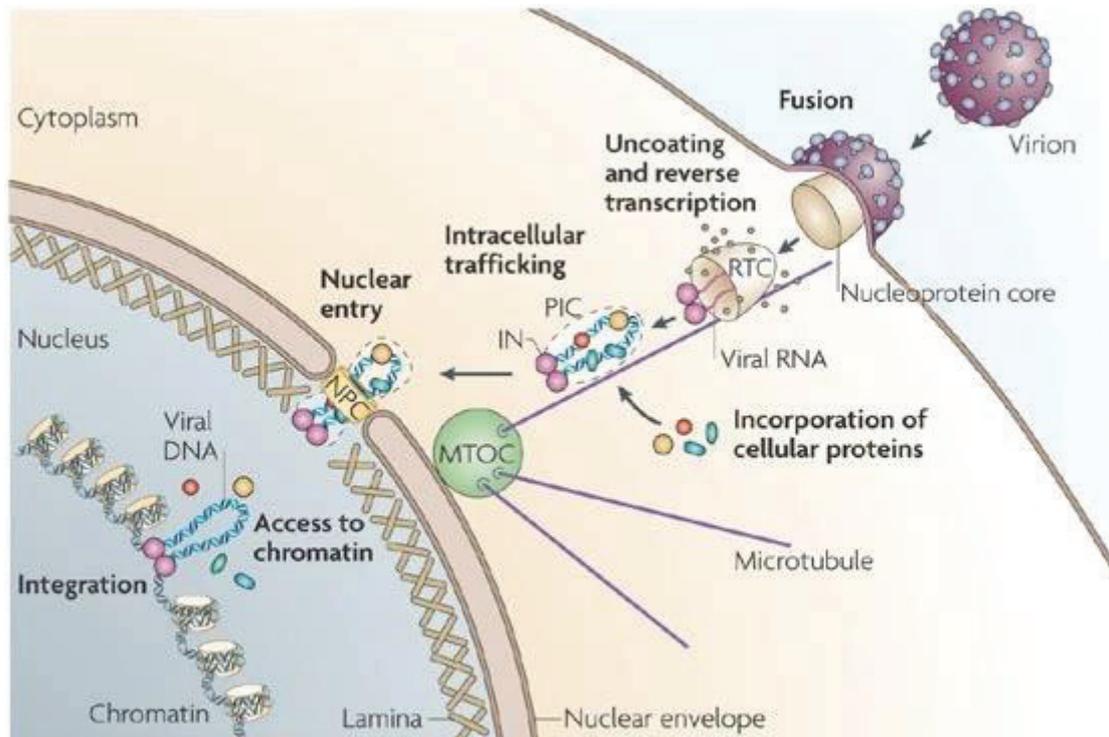
Chez le VIH-1, la capside est transportée jusqu'au noyau en recrutant des transporteurs moléculaires cellulaires utilisant le cytosquelette, plus précisément les microtubules (Dharan et Campbell, 2018 ; Malikov *et al.*, 2015 ; Novikova *et al.*, 2019 ; Santos da Silva *et al.*, 2020). Ces microtubules convergent vers le centre organisateur des microtubules situé à proximité du noyau (extrémités (-) (Lelek *et al.*, 2015)). Au voisinage du noyau, la capside interagit avec les nucléoporines des pores nucléaires ce qui permet l'entrée de la capside et donc du matériel génétique du virus (les interactions et les partenaires seront précisés dans la partie I.G page 38).

La rétrotranscription du génome en ADNdb a lieu au sein de la capside et est catalysée par la transcriptase inverse virale (Renner *et al.*, 2021 ; Song, 2020 ; Xu *et al.*, 2020). Des publications récentes suggèrent que la décapsidation a lieu à l'intérieur du noyau de la cellule infectée ou du moins la décapsidation complète. Il a également été montré que la rétrotranscription pourrait avoir lieu dans le noyau, après l'entrée de la capside dans ce dernier (Dharan *et al.*, 2020). À notre connaissance, le lieu de la décapsidation du FIV ou d'autres lentivirus n'a pas été étudié en détails mais nous pouvons supposer que ce mécanisme est partagé au sein de la famille des lentivirus.

### 4. Formation du complexe de pré-intégration

La transcription inverse a lieu dans la capside, soit encore intacte soit partiellement désassemblée selon les modèles proposés. Le produit de la rétrotranscription est donc le génome sous forme d'ADNdb. Cet ADNdb interagit avec l'intégrase virale IN, mais également avec des protéines cellulaires (Suzuki et Craigie, 2007). Chaque extrémité de l'ADNdb est liée à une intégrase. Chez le VIH-1, l'ensemble du complexe formé entre l'ADN, les protéines virales et cellulaires forme le complexe de pré-intégration (*Pre-integration complex*, PIC, Figure 6). Ce

complexe a une taille estimée à 30 nm (Suzuki et Craigie, 2007 ; Woodward *et al.*, 2009).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 6 : Déroulement de l'import du génome viral (modèle à décapsulation cytoplasmique). RTC : complexe de transcription inverse, PIC : complexe de pré-intégration, MTOC : centre organisateur des microtubules. (Suzuki et Craigie, 2007)

Les intégrases des lentivirus, y compris celle du VIH-1 et du FIV, interagissent avec des facteurs de transcription cellulaires. Par exemple, l'intégrase du VIH-1 interagit avec la protéine LEDGF/p75 humaine ; cette interaction permettrait de protéger l'intégrase de la dégradation (Llano *et al.*, 2004). Les nucléoporines humaines contribuent à l'import nucléaire du complexe de pré-intégration du VIH-1, comme les nucléoporines Nup153 (Figure 6) (Woodward et Chow, 2010). Pour le FIV, il a été montré que l'intégrase virale interagit avec LEDGF humaine (Llano *et al.*, 2004) qui partage 96 % d'identité de séquence avec LEDGF féline (entrées Uniprot O75475 et Q66T72 respectivement). Cette conservation de séquence suggère une conservation de l'interaction entre l'intégrase du FIV et LEDGF féline. Pour l'import du PIC du FIV, la protéine d'import nucléaire TNPO3 semble être la protéine permettant cet import (Kenyon et Lever, 2011 ; Krishnan *et al.*, 2010).

Une fois l'ADNdb synthétisé et importé dans le noyau, l'intégrase virale permet l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, dans un site de l'euchromatine ciblé par son cofacteur cellulaire. Cette insertion permet l'expression des différents gènes viraux.

## 5. Régulation de l'expression des protéines virales précoces et tardives

Les gènes précoces sont exprimés en premier au cours d'une infection par un lentivirus. Ces gènes sont exprimés *via* la transcription cellulaire, ce qui forme des ARNm ayant subi le processus d'épissage et de polyadénylation (Cullen, 1991). Les ARNm libérés permettent alors la production des protéines précoces, qui sont des protéines de régulation de l'expression des autres gènes viraux.

Chez le VIH-1, on retrouve ainsi la protéine transactivatrice Tat et la protéine d'export d'ARNm Rev. Ces protéines régulent l'expression génétique des gènes viraux ; la protéine transactivatrice stimule la transcription des gènes (Spector *et al.*, 2019). La protéine Rev permet l'export des ARNm partiellement ou non épissés (Cullen, 1991), qui codent les protéines tardives, dont les polyprotéines Env, Pr55<sup>Gag</sup> ou Gag et Gag-Pol (Knipe et Howley, 2013).

Ces gènes ont leurs homologues chez le FIV (Kenyon et Lever, 2011), avec la protéine Orf-A qui aurait de nombreux rôles, dont un similaire à celui de Tat (Gemeniano, Sawai et Sparger, 2004 ; Pistello *et al.*, 2002 ; Sundstrom *et al.*, 2008), et la protéine FIV Rev (Marchand, Lemay et Archambault, 2020 ; Phillips *et al.*, 1992). Ainsi, de la même façon ces protéines permettent la formation des polyprotéines d'enveloppe et de structure.

## 6. Expression et assemblage des protéines structurales et formation des virions

La polyprotéine Env est une glycoprotéine membranaire. Elle porte un peptide signal vers la voie sécrétoire et contient un site de clivage protéolytique d'une protéase cellulaire de la voie sécrétoire (Verschoor *et al.*, 1993). La polyprotéine d'enveloppe FIV gp150 est clivée en la protéine gp100/SU et la protéine gp36/TM. Ces deux sous-unités sont les équivalents de gp120 et gp41 du VIH-1, respectivement. Ces deux fragments de clivage restent liés par liaisons faibles. Le fragment gp100 est exposé à la membrane des virions et interagit avec le récepteur cible pour l'entrée du virus dans la cellule (Kenyon et Lever, 2011 ; Scott *et al.*, 2008).

L'autre polyprotéine structurale du virion, la polyprotéine Gag, porte les sous-unités impliquées dans la formation des complexes supramoléculaires internes au virion. Le transcrit à l'origine de la protéine Gag peut également générer la polyprotéine Gag-Pol par mécanisme de décalage du cadre de lecture sur le ribosome. En effet, le même transcrit contient les deux gènes *gag* et *pol* séparés par un codon-stop. La plupart des peptides issus de la traduction de ce transcrit s'arrête donc sur ce codon-stop. Cependant la séquence ARN de *gag* permet la formation de structures tige-boucle particulières de l'ARNm au niveau de ce codon-stop, pouvant induire un décalage du cadre de lecture sur le ribosome (décalage de -1) menant à la traduction de la polyprotéine Gag-Pol. Ce processus est assez rare ; chez VIH-1 il est estimé qu'une fraction de 0,1% à 5 % des processus de

traduction amènent à la synthèse de la polyprotéine Gag-Pol (Mouzakis *et al.*, 2013 ; Novikova *et al.*, 2019 ; Reil *et al.*, 1993).

La partie Pol contient des sous-unités à activité enzymatique. La protéine FIV Pol contient la rétrotranscriptase RT, la désoxyuridine 5'-triphosphate nucléotidohydrolase DU, l'intégrase IN et la protéase PR (Figure 7), qui sont ainsi incorporées dans les virions lors de l'assemblage des protéines Gag et Gag-Pol à la membrane. Le virion formé contient donc ainsi les protéines structurales et les enzymes nécessaires à l'accomplissement du cycle viral dans la cellule néo-infectée.

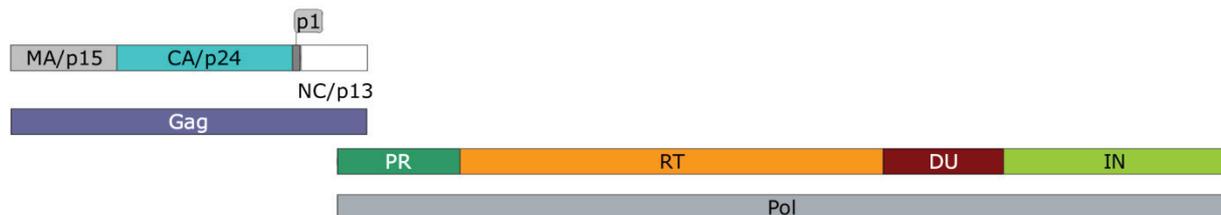


Figure 7 : Organisation de la polyprotéine Gag et Gag-Pol du FIV. Le processus de décalage du cadre de lecture peut se produire au niveau du codon-stop suivant la sous-unité NC/p13 de Gag, ce qui amène à la synthèse de la polyprotéine Gag-Pol. La partie Pol contient des sous-unités à activité enzymatique : la protéase virale PR, la rétrotranscriptase RT, la dUTP nucléotidohydrolase DU et l'intégrase IN.

Les polyprotéines FIV Gag et FIV Gag-Pol s'assemblent alors entre elles et interagissent avec un dimère d'ARNg (González et Affranchino, 2018). Elles interagissent avec les polyprotéines d'enveloppe et les recrutent au niveau de la membrane (Affranchino et González, 2014) et permettent l'assemblage des virions par bourgeonnement, sous leur forme immature.

L'assemblage des polyprotéines Gag se fait de façon sphérique ou quasi-sphérique, ce qui crée le bourgeonnement à la membrane plasmique. Les protéines Gag recrutent ultimement les protéines de la voie de l'exocytose qui terminent le bourgeonnement et permettent la libération du virion pour initier un nouveau cycle viral (cet aspect sera détaillé dans la partie suivante).

## E. La polyprotéine Gag des lentivirus

La polyprotéine Gag (pour « groupement antigénique ») est une protéine de structure des lentivirus qui contient plusieurs sous-unités impliquées dans l'architecture structurale du virus. Les sous-unités chez les différents lentivirus sont présentées sur le schéma suivant (Figure 8).

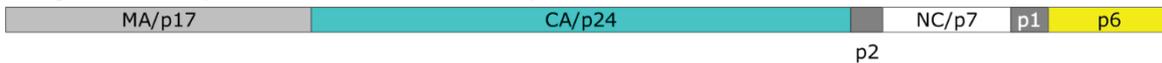
Dans le cas du FIV, la polyprotéine FIV Gag est clivée par la protéase virale, ce qui libère plusieurs sous-unités : la sous-unité MA/p15, CA/p24, un domaine espaceurs p1 et la sous-unité NC/p13 (Elder *et al.*, 1993). La nomenclature MA/CA/NC est commune à l'ensemble des rétrovirus et fait référence à leur rôle structural (MA : protéine de la matrice ; CA : protéine de la capsid ; NC : protéine de nucléocapsid). La seconde nomenclature renvoie à la masse apparente de ces

fragments sur gel SDS-PAGE (en kilodaltons, kDa). Les masses apparentes ne correspondent pas à la masse exacte de la protéine (Figure 8).

#### Gag Visna (442 acides aminés)



#### Gag VIH-1 (499 acides aminés)



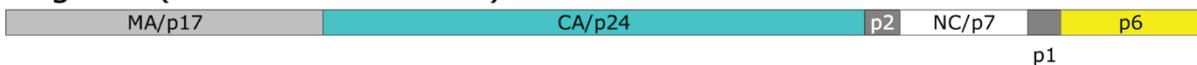
#### Gag FIV (450 acides aminés)



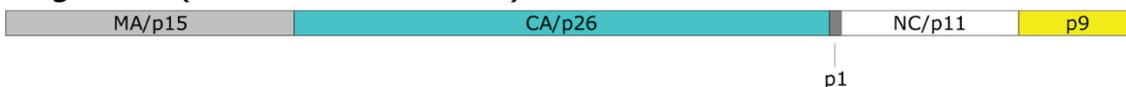
#### Gag CAEV (442 acides aminés)



#### Gag SIV (505 acides aminés)



#### Gag EIAV (486 acides aminés)



#### Gag BIV (477 acides aminés)



Figure 8 : Comparaison des différentes sous-unités Gag des lentivirus. Elles varient en longueur et présentent différents sites de clivage protéolytique qui amènent à la libération de plusieurs sous-unités (protéine de matrice en gris clair, protéine de capsid en bleu, protéine de nucléocapsid en blanc, domaines espaceurs en gris foncé, domaine tardif (p6 ou p9) en jaune). Selon les espèces, le domaine tardif n'est pas individualisé et est lié à la protéine de nucléocapsid. Protéines Visna Gag, VIH-1 Gag, FIV Gag CAEV Gag, SIV Gag, EIAV Gag, BIV Gag : entrées UniProtKB P03352, P12493, P16087, P33458, P05893, P69732, P19558, respectivement.

Cette organisation de la polyprotéine Gag est ainsi partagée chez l'ensemble des lentivirus, avec cependant de petites variations sur les longueurs des fragments et sur le nombre de sites de clivage protéolytique (Figure 8) (Cowley et Mackin, 1997). Ainsi chez le VIH-1, la polyprotéine Gag est clivée en MA/p17, CA/p24, un fragment espaceur SP1/p2, NC/p7, un autre fragment espaceur SP2/p1 et la protéine p6. Il y a ainsi trois différences notables entre VIH-1 et FIV à ce niveau : la taille de la protéine de matrice légèrement plus grande chez le VIH-1, l'existence d'un fragment espaceur supplémentaire chez le VIH-1 et l'absence de site de coupure protéolytique sur NC/p13 chez le FIV par rapport au VIH-1 où la protéine est séparée en NC + p6 par ce site supplémentaire (Figure 8).

Ces sous-unités assurent chacune une fonction avant la maturation au sein du précurseur Gag, mais également après maturation et après leur réassemblage qui forme les structures virales de matrice, capsid et nucléocapsid (Figure 9).

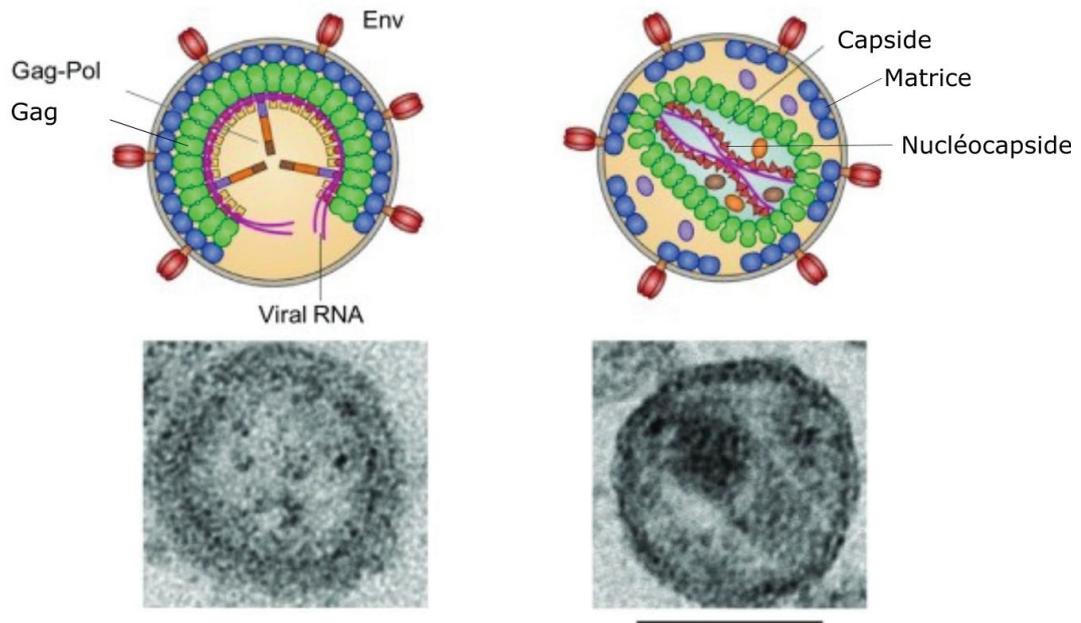
**Virion de VIH-1 immature****Virion de VIH-1 mature**

Figure 9 : Architecture des virus immatures et matures. Les images du bas sont des clichés de microscopie électronique à transmission sur des virions immatures et matures. Au sein des virus immatures, les protéines Gag sont distribuées radialement sur la particule virale. Après maturation, les assemblages supramoléculaires se forment. Barre d'échelle : 100 nm (d'après Novikova et al., 2019).

Chez le FIV comme le VIH-1, la sous-unité MA a une affinité pour la membrane plasmique *via* son ancre lipidique de myristoylation et son domaine basique, chargé positivement et établissant alors des liaisons électrostatiques avec les lipides de la membrane chargés négativement (Brown *et al.*, 2015 ; Chukkapalli et Ono, 2011). Cela permet une accumulation des polyprotéines Gag à la membrane. La sous-unité NC contient deux motifs à doigts de zinc liant les acides nucléiques et reconnaît le génome viral sous sa forme de dimères d'ARNg *via* la séquence  $\psi$  portée par l'ARNg (Manrique *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2014). Enfin, la sous-unité p24 est capable d'interaction avec les autres sous-unités p24 des polyprotéines Gag, ce qui stabilise les interactions entre différentes sous-unités Gag (Briggs *et al.*, 2009 ; Wright *et al.*, 2007).

La maturation des polyprotéines Gag se fait par protéolyse, catalysée par la sous-unité PR des protéines Gag-Pol. Les sous-unités libérées par le clivage protéolytique se réorganisent ensuite selon leurs affinités pour leurs partenaires : les sous-unités MA forment la matrice du virus, située sous la membrane. Les sous-unités NC se lient au dimère d'ARNg et forment la nucléocapside. Cette nucléocapside est enfermée au sein d'une structure supramoléculaire, la capsid, formée par l'assemblage des sous-unités p24.

L'export des ARNg depuis le noyau déclenche le processus d'assemblage viral. Le processus a été particulièrement étudié pour le VIH-1. Les domaines NC de la polyprotéine Gag se lient autour des dimères d'ARNg par la reconnaissance des

séquences  $\psi$  formant des structures tige-boucle reconnues par NC (Guo *et al.*, 2020 ; Iraci *et al.*, 2018 ; de Rocquigny *et al.*, 2014). Cela crée un point de nucléation de quelques polyprotéines autour de l'ARNg. Les complexes ribonucléoprotéiques formés sont acheminés à la membrane par l'intermédiaire de l'ancrage par la sous-unité MA *via* son ancre de myristoylation et son domaine basique (Figure 10). Chez le FIV, les domaines NC sont également impliqués dans la reconnaissance de la région  $\psi$  de l'ARN génomique du FIV (Manrique *et al.*, 2004).

Puis, les sous-unités p24 au sein de Gag interagissent entre elles *via* leur domaines N-terminaux selon un assemblage hexamérique (Novikova *et al.*, 2019). Les domaines espaceurs entourant la sous-unité de capsid sont nécessaires à la flexibilité des sous-unités p24 au sein de Gag. Les réarrangements structuraux de ces domaines et espaceurs sont nécessaires à la formation des hexamères : ceux du domaine C-terminal de p24 et du domaine espaceur SP1/p2 (Figure 11) (Novikova *et al.*, 2019 ; Wagner *et al.*, 2016 ; Wright *et al.*, 2007). Les protéines Gag possèdent plusieurs lysines au niveau du domaine p24 (K290 et K359) qui, lorsque les monomères s'assemblent en hexamères, forment un anneau de lysine portant des charges positives. Ces charges sont stabilisées par un polyanion, l'inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) (Dick, Mallery, *et al.*, 2018).

Ces assemblages stabilisent la structure sphérique composée d'hexamères de Gag qui se forme à la membrane plasmique. Ainsi, l'arrangement hexamérique des protéines Gag au niveau de la membrane plasmique initie le bourgeonnement des virions à la membrane. L'assemblage se termine par la formation d'une sphère incomplète au niveau de la membrane plasmique, qui permet alors la libération des virions. Il est estimé qu'entre 1 500 et 4 000 unités Gag ou Gag-Pol sont incorporées au sein d'un virion (Arhel, 2010 ; Carlson *et al.*, 2010).

L'assemblage uniquement hexamérique favorise la formation d'une surface à faible courbure (Briggs *et al.*, 2009 ; Wright *et al.*, 2007). L'assemblage des protéines Gag laisse quelques zones de la sphère non recouvertes. Cette incomplétude dans la fermeture de la sphère permet de répondre à la contrainte liée à l'absence de pentamère dans la structure immature (Figure 12).

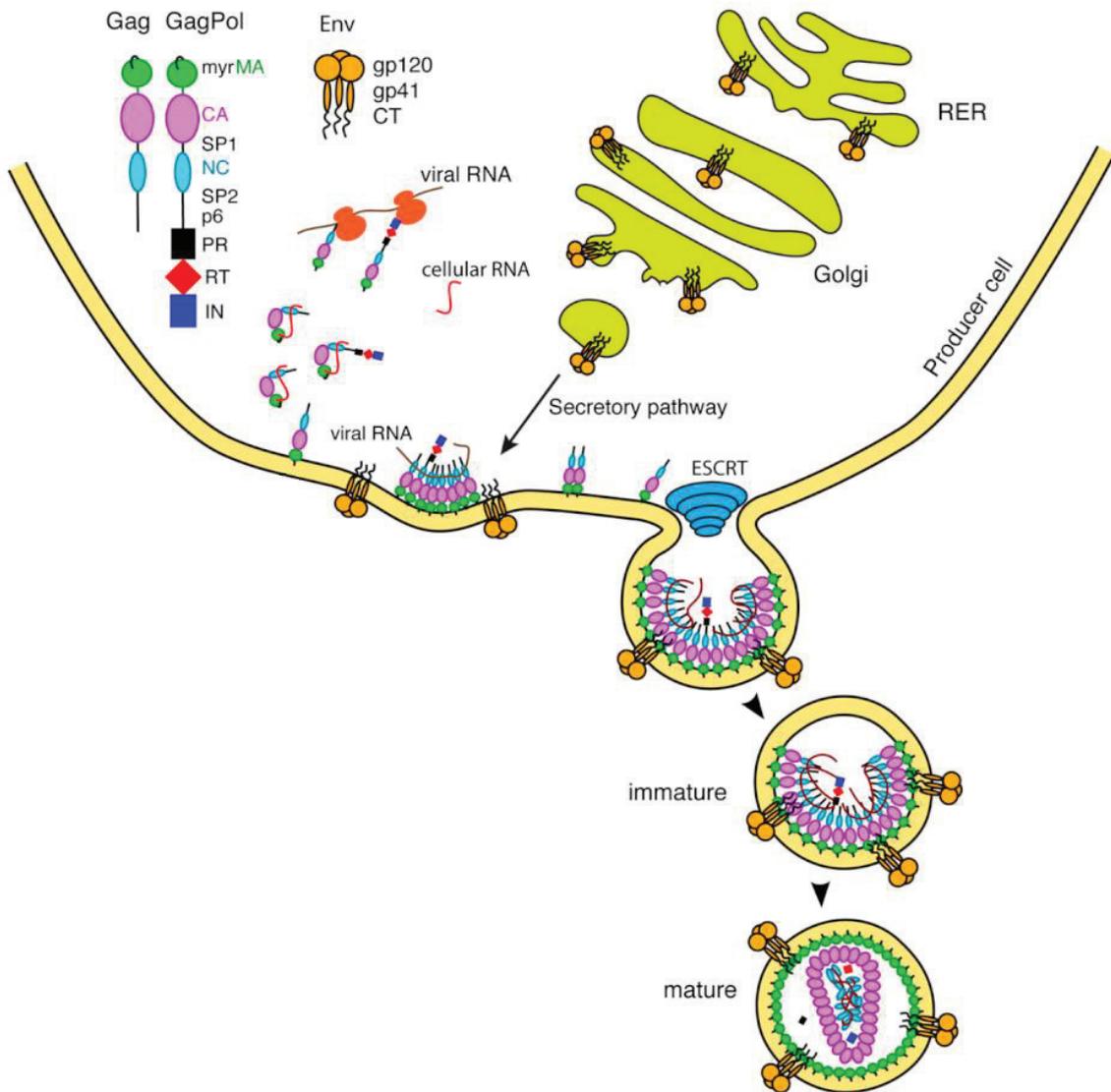


Figure 10 : Déroulement de l'assemblage du VIH-1 à la membrane de la cellule infectée. myrMA : protéine MA myristoylée, SP1 et SP2 : peptides espaceurs (respectivement p2 et p1), CT : domaine cytoplasmique de gp41 (*cytoplasmic tail*), RER : réticulum endoplasmique rugueux, ESCRT : complexe ESCRT de l'exocytose. D'après (Murphy et Saad, 2020).

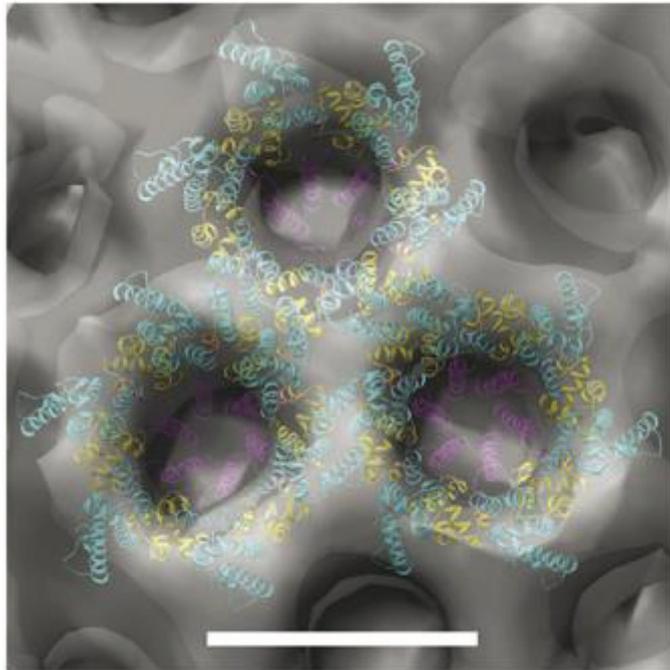


Figure 11 : Assemblage hexamérique des protéines VIH-1 Gag dans les virions immatures. Les observations en cryo-microscopie électronique ont permis d'obtenir une carte de densité dans laquelle ont été positionnés les domaines N-terminaux de p24 (cyan), C-terminaux de p24 (jaune) et SP1 (magenta). Barre d'échelle : 8 nm. (Wright *et al.*, 2007).

Les lacunes dans l'assemblage sur la sphère entière des protéines Gag concernent entre 40 et 60 % de la sphère (Carlson *et al.*, 2008 ; Wright *et al.*, 2007). Les domaines C-terminaux de Gag présentent un motif conservé nommé PT/SAP (NC/p13, acides aminés 72-75 chez le FIV, p6, acides aminés 7-10 chez le VIH-1) capables de recruter le complexe ESCRT du trafic vésiculaire et d'exocytose (Williams et Urbé, 2007). Le complexe ESCRT clôt le bourgeonnement initié au niveau de la membrane et permet la libération du virion (Briggs *et al.*, 2009 ; Carlson *et al.*, 2008, 2010 ; Vecchio *et al.*, 2020).

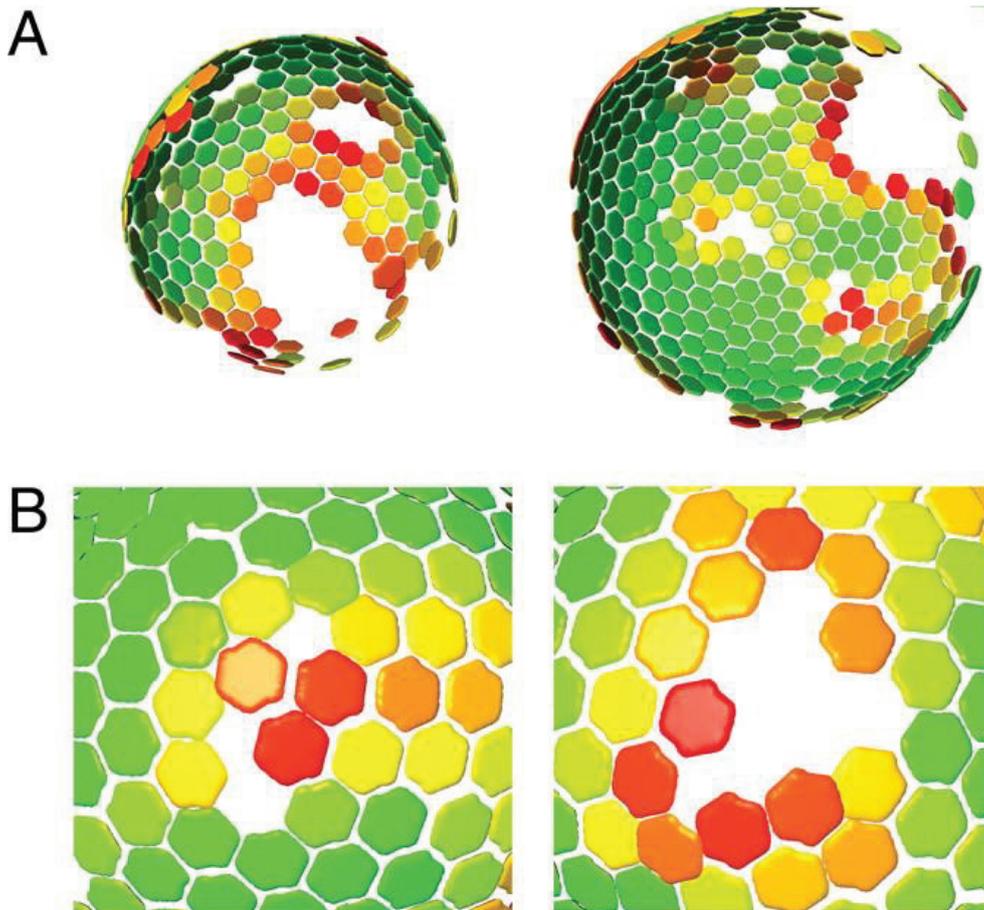


Figure 12 : Défauts d'assemblage sphérique des hexamères de Gag. Les cartes ont été construites depuis les observations en microscopie électronique à transmission des particules virales. Les simulations informatiques ont corrélé les signaux observés avec les signaux théoriques associés à un assemblage des hexamères en une sphère. Le code couleur des hexamères indique une bonne corrélation entre ces deux signaux (en vert) ou mauvaise (en rouge). Certaines zones de la sphère ne sont pas couvertes par le réseau hexamérique de Gag. A) Vues de la particule virale entière. B) Vues sur les zones où l'assemblage de Gag présente des défauts. (Briggs *et al.*, 2009)

## F. La capsidie des lentivirus

La capsidie est un assemblage supramoléculaire retrouvée chez l'ensemble des lentivirus, issue de l'assemblage d'une même protéine, la sous-unité CA/p24. Elle contient et protège le génome viral (Campbell et Hope, 2015) et permet son transport jusque dans le noyau (Dharan et Campbell, 2018 ; Santos da Silva *et al.*, 2020). L'assemblage permet d'exclure les RNAses cytosoliques ou les protéines senseurs d'ARN viraux (Campbell et Hope, 2015 ; Gao *et al.*, 2013) et de maintenir la transcriptase inverse à proximité de l'ARNg et donc de favoriser la transcription inverse du génome viral. De la même façon que précédemment, la capsidie la plus étudiée est celle du VIH-1.

La capsidie mature se forme spontanément dans les virions après clivage de la polyprotéine Gag par la protéase et libération de la sous-unité p24. Cette protéine contient deux domaines, N et C-terminaux, reliés par une courte boucle flexible. Le domaine N-terminal contient une boucle riche en proline qui interagit avec des

isomérases peptidyl-proline comme le cyclophiline A (page 38) (Figure 13). Cette caractéristique est retrouvée chez le SIV, VIH-1 et VIH-2 et le FIV. Cette protéine p24 s'assemble spontanément pour former la capside virale. Alors que p24 au sein de Gag ne formait que des hexamères, les sous-unités libérées s'assemblent en hexamères et en pentamères pour former la capside virale.

**Boucle riche  
en proline**

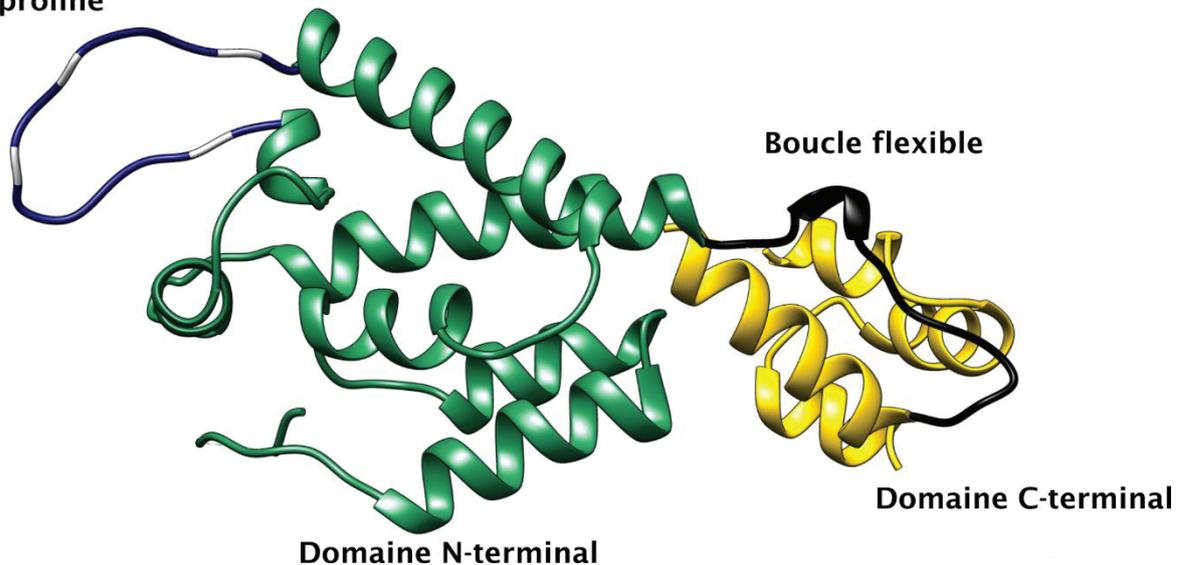


Figure 13 : Structure de la protéine VIH-1 p24. Les deux domaines N et C-terminaux (vert et jaune, respectivement) sont reliés par une boucle flexible (noir). Le domaine N-terminal contient une boucle riche proline (boucle en bleu, prolines en blanc). Entrée PDB 3MGE (Pornillos *et al.*, 2010).

Chez le VIH-1, la structure de la capside virale mature a été résolue grâce à des observations en cryo-microscopie électronique (cryoEM) à transmission (Zhao *et al.*, 2013). Elle est constituée d'assemblages pentamériques et hexamériques (les capsomères), assemblés en une forme fullerène, respectant les contraintes de la symétrie icosaédrique (12 pentamères et des hexamères) mais sans adopter de forme géométrique régulière d'après des observations en cryoEM qui témoignent d'une forte variabilité des formes des capsides (Arhel, 2010 ; Briggs *et al.*, 2004). On parle ainsi d'assemblage pseudo-icosaédrique (Figure 14).

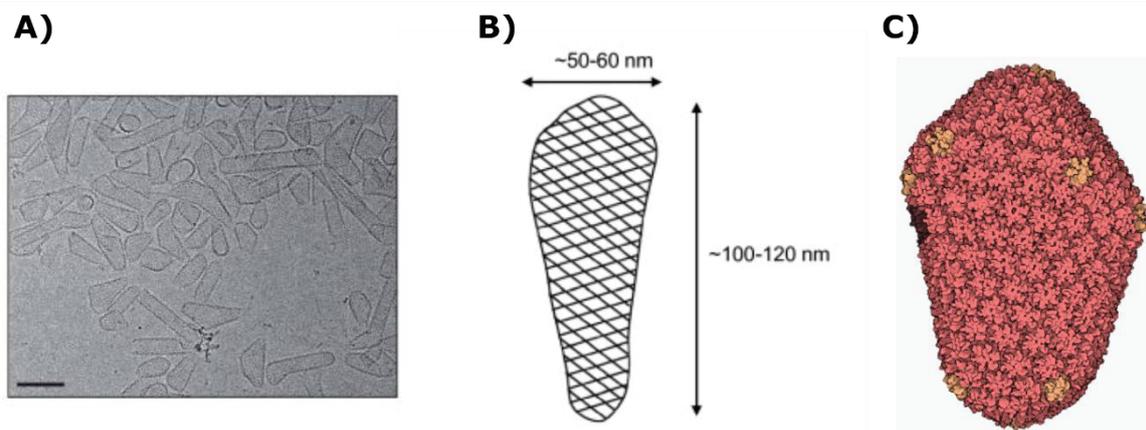


Figure 14 : Structure de la capsid du VIH. Les observations en microscopie électronique (Zhao *et al.*, 2013) (barre d'échelle : 100 nm) ont permis la reconstruction de la structure de la capsid. B) schéma de la capsid et de la forme pseudo-icosaédrique (Arhel, 2010). C) Modèle atomique de la capsid reconstruit depuis les structures individuelles des pentamères et hexamères et les observations de la capsid complète en microscopie électronique (Pornillos, Ganser-Pornillos et Yeager, 2011).

Les acides aminés chargés positivement de la sous-unité VIH-1 p24 forment des anneaux au sein des capsomères, comme les anneaux de lysine de la polyprotéine Gag avant maturation (voir la partie I.E, page 27 (Dick, Mallery, *et al.*, 2018 ; Mallery *et al.*, 2018)). Ces anneaux sont également stabilisés par le polyanion IP<sub>6</sub> au niveau de l'arginine 18 de p24 après maturation (Renner *et al.*, 2021). Les interactions électrostatiques entre les anneaux chargés positivement et l'IP<sub>6</sub> stabilisent la capsid et augmente sa durée de vie au sein de la cellule néo-infectée.

Chez le FIV, la capacité de la sous-unité CA/p24 à s'autoassembler pour former la capsid a également été décrite (Affranchino et González, 2010 ; Serrière, Fenel, *et al.*, 2013). Il a donc été inféré que de la même façon, cette structure répondant aux mêmes contraintes que chez VIH-1, la capsid de FIV est formée d'hexamères et de 12 pentamères et que les processus d'assemblage de la capsid de VIH-1 et de FIV sont similaires (Reed *et al.*, 2018).

La structure des capsomères du VIH-1 a ensuite été résolue par cristallographie aux rayons X et, plus récemment, par RMN du solide et cryo-EM (Lu *et al.*, 2020 ; Pornillos *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2013) (Figure 15). Chez le FIV, à ce jour il n'y a pas de structure atomique des capsomères. La structure de FIV p24 isolée, sous forme monomérique seule, a précédemment été obtenue dans l'équipe (Folio *et al.*, 2017) (entrée PDB 5NA2, Figure 16).

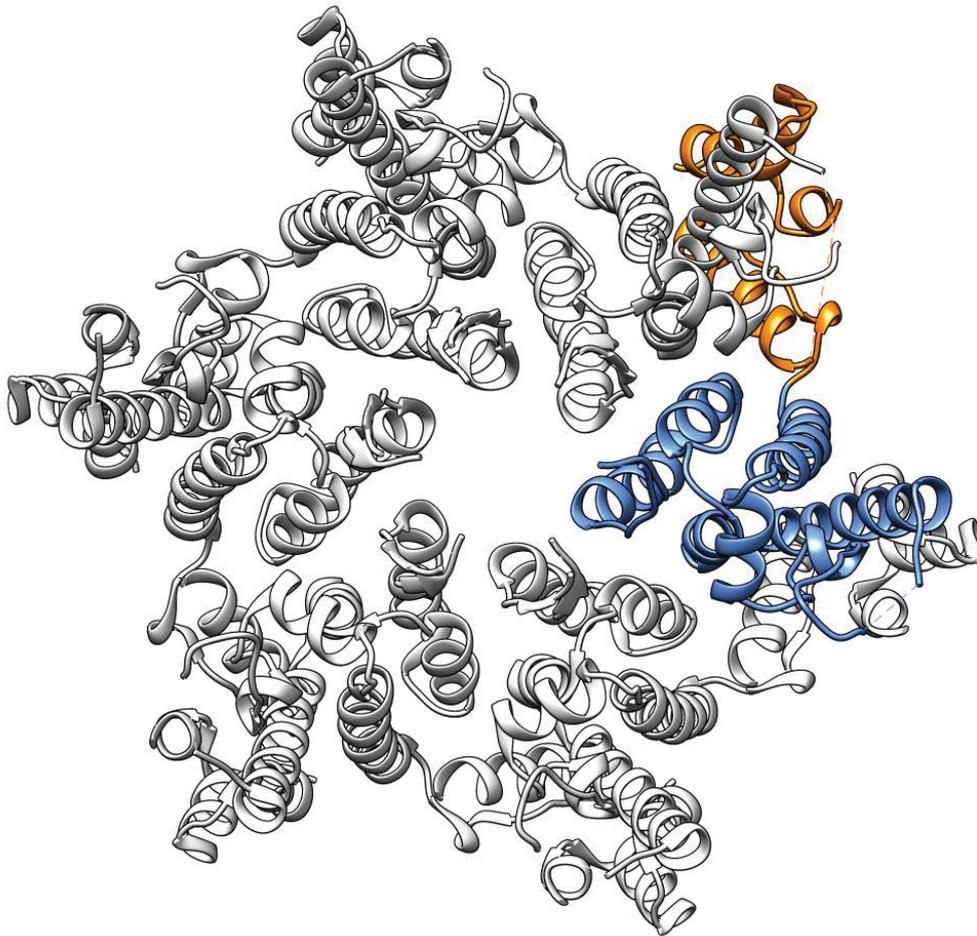


Figure 15 : Structure d'un hexamère de VIH-1 p24. Un monomère est mis en valeur en couleur, avec le domaine N-terminal de la protéine en bleu et le C-terminal en orange. Les domaines N-terminaux interagissent avec les N-terminaux de leurs voisins et le C-terminal d'un voisin au sein de l'hexamère (entrée PDB 3H47).

La structure d'une protéine p24 est composée majoritairement d'hélices  $\alpha$  et de deux courts brins  $\beta$  à son extrémité N-terminale. La protéine p24 est constituée de deux domaines, N-terminal et C-terminal, séparés par une boucle flexible (Figure 16 A). Les deux protéines présentent une très forte homologie structurale et chaque domaine de FIV p24 est superposable à son équivalent de VIH-1 p24. Malgré une homologie de séquence de seulement 30 % entre les deux protéines, leur repliement est conservé (Figure 16 B). En revanche, la boucle flexible, dont la séquence est peu conservée, n'adopte pas la même conformation dans le cristal de FIV p24 que dans l'hexamère de VIH-1 p24. Ainsi, les deux domaines N- et C-terminaux ne sont pas positionnés de la même façon l'un par rapport à l'autre dans ces deux formes. Or, la structure cristalline de l'hexamère de VIH-1 p24 révèle que le domaine C-terminal interagit avec le domaine N-terminal d'une autre chaîne voisine dans le capsomère et ainsi de suite pour stabiliser la structure (Figure 15). De plus, la structure de FIV p24 a été obtenue dans le contexte d'une conformation dimérique artificielle avec les deux chaînes reliées par un pont disulfure dû aux conditions de cristallogénèse.

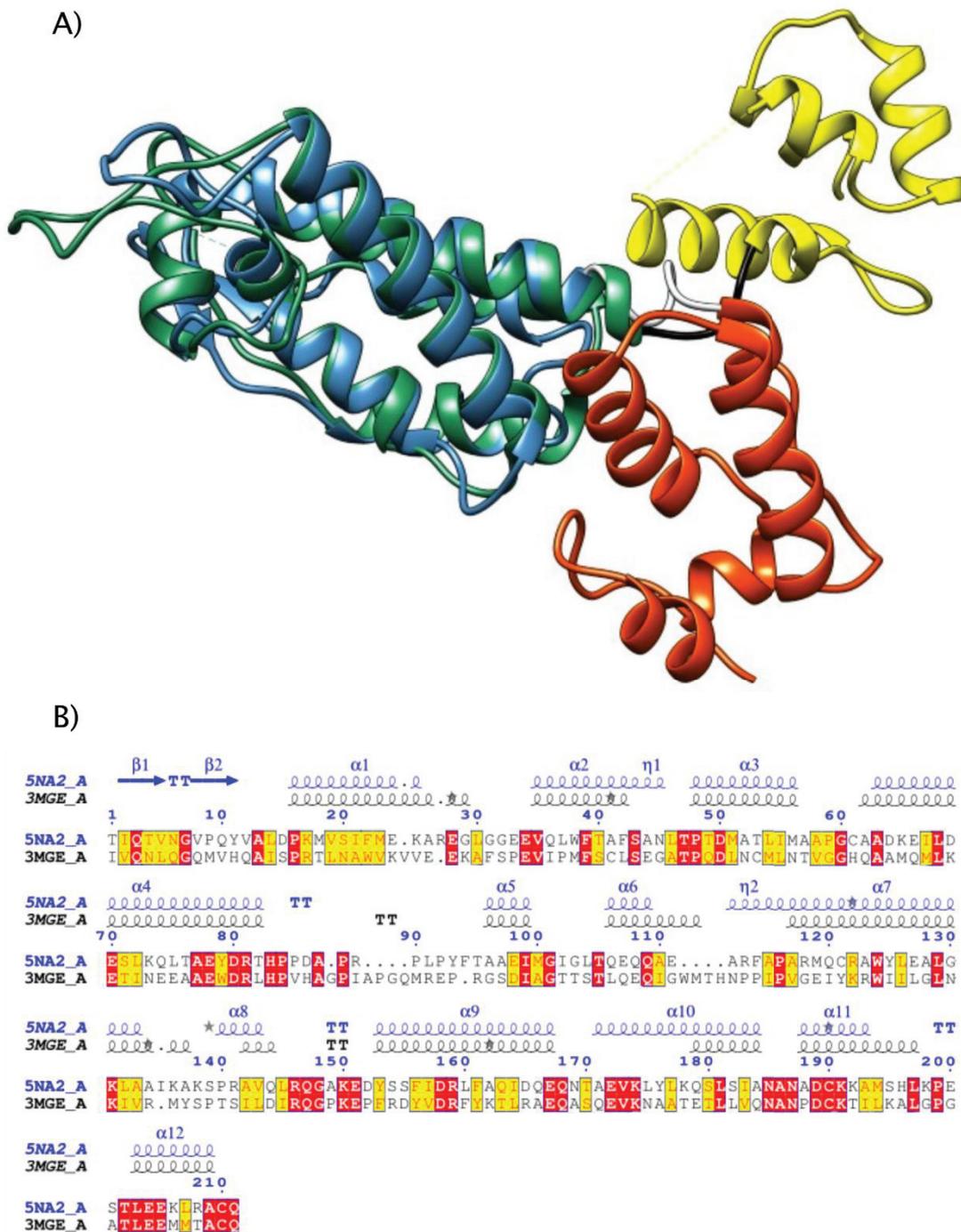


Figure 16 : Comparaison des structures de VIH-1 p24 et FIV p24 (Folio *et al.*, 2017 ; Pornillos *et al.*, 2010) (entrées PDB 3MGE et 5NA2, respectivement). A) Superposition des structures de VIH-1 p24 (domaine N-terminal en vert, C-terminal en jaune et *linker* en noir) et de FIV p24 : (domaine N-terminal en bleu, C-terminal en orange et *linker* en blanc). B) Comparaison des séquences et des structures secondaires de deux protéines. L'alignement des séquences a été réalisé par le serveur ENDscript.

Cet artéfact crée une contrainte dans la structure adoptée par la protéine dans le cristal et contribue à la différence de flexion de la boucle entre les deux domaines. Ces différences structurales nous empêchent de modéliser la structure

hexamérique depuis le monomère en l'absence de structure publiée pour les capsomères de FIV.

## G. Les partenaires cellulaires de la capsid

La capsid des lentivirus est capable d'interagir avec de nombreux partenaires cellulaires. Ces interactions participent à la réalisation du cycle viral, notamment au transport de la capsid depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau cellulaire. Certaines interactions sont nécessaires à l'établissement du cycle viral et permettent l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, alors que d'autres protéines agissent comme facteurs de restriction de l'infectiosité des rétrovirus, qui ont principalement été étudiées chez le VIH.

### 1. Les facteurs de restriction ciblant la capsid

Les cellules expriment de nombreux facteurs de restriction antiviraux qui limitent les possibilités d'infection par les virus. La problématique de l'échappement à ces facteurs de restriction se pose ainsi pour l'ensemble des virus.

Par exemple, la protéine TRIM5 $\alpha$  chez la souris limite l'infection au *Murine Leukemia Virus* (MLV) par accélération de la décapsidation (Dietrich *et al.*, 2011 ; Perron *et al.*, 2007). Les protéines TRIM5 $\alpha$  sont des E3 ubiquitine ligases qui facilitent la dégradation des protéines de capsid et la décapsidation (Danielson et Hope, 2013). Leurs rôles dans une protection contre les infections par VIH-1 ont été très étudiés comme moyen thérapeutique (Ganser-Pornillos et Pornillos, 2019 ; Sastri et Campbell, 2011).

La coévolution entre lentivirus et Mammifères a amené à la sélection de souches virales moins sensibles à la restriction par les TRIM5 $\alpha$  des cellules qu'elles infectent. Ainsi, les TRIM5 $\alpha$  simiennes sont capables de restreindre les infections au VIH-1, mais pas les TRIM5 $\alpha$  humaines (Stremlau *et al.*, 2005). Les TRIM5 $\alpha$  de *Macaca mulatta* et humaines sont capables d'inhiber l'infection par le FIV des cellules simiennes et humaines (Diaz-Griffero *et al.*, 2007 ; Saenz *et al.*, 2005).

L'analyse de lentivirus anciens et actuels montre par exemple une conservation de la boucle de fixation de la cyclophiline A, une isomérase peptidyl-proline cellulaire (Goldstone *et al.*, 2010). Cette protéine est conservée chez l'ensemble des Mammifères. La fixation de TRIM5 $\alpha$  sur la protéine de capsid a été observée chez le VIH-1 (Gamble *et al.*, 1997), le virus de l'immunodéficience simienne SIV<sub>cpz</sub>, SIV<sub>agm</sub> et le FIV. Dans le cas du FIV, VIH-1 et SIV, TRIM5 $\alpha$  se fixe sur la boucle riche en proline de leur protéine de capsid, capable donc de fixer la cyclophiline A (voir Figure 13 page 34) (Dietrich *et al.*, 2011 ; Lin et Emerman, 2006). De façon intéressante, l'inhibition de l'interaction entre p24 et la cyclophiline A par la cyclosporine A (CsA) diminue l'infectivité des virions VIH-1 (Franke et Luban, 1996).

Dans le noyau, les facteurs de restriction Mx2 (aussi appelés MxB) limitent l'infection par les rétrovirus (Goujon *et al.*, 2013, p. 2 ; Kane *et al.*, 2013, 2018 ; Liu *et al.*, 2013). Ces protéines font partie des gènes stimulés par les interférons et se

localisent à l'intérieur du noyau, à proximité des pores nucléaires (Melén *et al.*, 1996). Mx2 réduit la fréquence des intégrations de l'ADN viral du VIH-1 dans le génome cellulaire. Mx2 interagit directement avec la protéine de capsid du VIH-1 (Smaga *et al.*, 2019) mais l'effet inhibiteur est dépendant de l'interaction de la capsid avec CypA (Liu *et al.*, 2013). Certaines mutations de la protéine de capsid du VIH-1 diminuent l'efficacité de Mx2 à restreindre l'infectiosité (Kane *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2013 ; Smaga *et al.*, 2019). La protéine humaine Mx2 restreint l'infection par le VIH-1, mais pas par le FIV ou EIAV (Goujon *et al.*, 2013). Ces deux résultats témoignent d'une certaine sélectivité de la protéine Mx2 pour la reconnaissance de la cible.

## 2. Les protéines nécessaires au cycle viral

Après fusion des enveloppes virale et membranaire, la capsid se retrouve au niveau de la membrane plasmique. La capsid est transportée au voisinage du noyau *via* son interaction avec les protéines associées aux microtubules et les transporteurs moléculaires de la famille des kinésines (Novikova *et al.*, 2019) et des dynéines (Carnes, Zhou et Aiken, 2018 ; Novikova *et al.*, 2019 ; Zhuang et Torbett, 2021). L'interaction avec les kinésines demeure contre-intuitive puisque les transporteurs de cette famille transportent vers les extrémités (+) des microtubules, et donc vers la membrane plasmique. Cet antagonisme dans l'interaction avec les transporteurs progrades et rétrogrades reste incompris, mais les auteurs ont cependant démontré que ces deux interactions sont nécessaires pour l'infection.

L'interaction entre les nucléoporines et la capsid est nécessaire à l'import de la capsid au sein du noyau et son désassemblage. La capsid du VIH-1 est ainsi capable d'interagir avec des protéines de la superfamille des nucléoporines et caryophérines comme les protéines Nup153 et Nup358 (Di Nunzio *et al.*, 2012) ou la transportine 3 (Tnp3) (Zhou *et al.*, 2011).

Les nucléoporines Nup153 et Nup358 sont exposées côté cytosolique et la nucléoporine Nup153 permet le transport de la capsid au travers des pores nucléaires (Buffone *et al.*, 2018). L'interaction Nup153 – VIH-1 p24 a été caractérisée *in vitro* (Price *et al.*, 2014). Dans le cas de FIV, les nucléoporines Nup155 et Nup160 félines semblent davantage impliquées dans le transport que Nup153 *in cellulo* (Lee *et al.*, 2010).

Il a été suggéré que Tnp3 facilite l'export vers le cytoplasme des sous-unités p24 dissociées pendant le processus de décapsidation qui aurait lieu dans le noyau, et contribuerait ainsi à déplacer l'équilibre en faveur de la décapsidation (Zhou *et al.*, 2011).

L'intégration du génome dans l'euchromatine dépend également des interactions de la capsid avec les protéines nucléaires. À l'intérieur du noyau, la capsid interagit avec la sous-unité 6 du facteur spécifique de clivage et polyadénylation (CPSF6) humaine (Fricke *et al.*, 2013 ; Iaco *et al.*, 2013). La protéine hCPSF6 est une protéine cellulaire portant un signal de localisation nucléaire (NLS). Elle

s'accumule ainsi dans le noyau et localise à proximité des pores nucléaires, ou entre la capsid lors de l'infection (Lelek *et al.*, 2015). La protéine hCPSF6 interagit avec les ARNm naissant depuis l'euchromatine. L'interaction VIH-1 p24:hCPSF6 guide ainsi la capsid vers un ARNm en cours de polyadénylation et donc, vers une zone d'euchromatine (Chin *et al.*, 2015 ; Marini *et al.*, 2015). Ainsi, ces interactions p24:CPSF6 guident la capsid contenant le génome viral vers une zone d'euchromatine, ce qui favorise l'intégration du génome rétroviral dans une région fortement exprimée du génome cellulaire.

Ainsi, l'ensemble de ces interactions entre les protéines cellulaires, qui permettent l'infection comme les nucléoporines et CPSF6, ou les facteurs de restriction comme CypA, TRIM5 $\alpha$  ou Mx2 témoigne de l'importance de la capsid comme cible thérapeutique. Déstabiliser la capsid à un stade précoce, stabiliser la capsid et inhiber son désassemblage ou saturer les interfaces d'interaction avec les partenaires cellulaires représentent ainsi des cibles thérapeutiques majeures. La Figure 17 récapitule les protéines cellulaires interagissant avec la capsid.

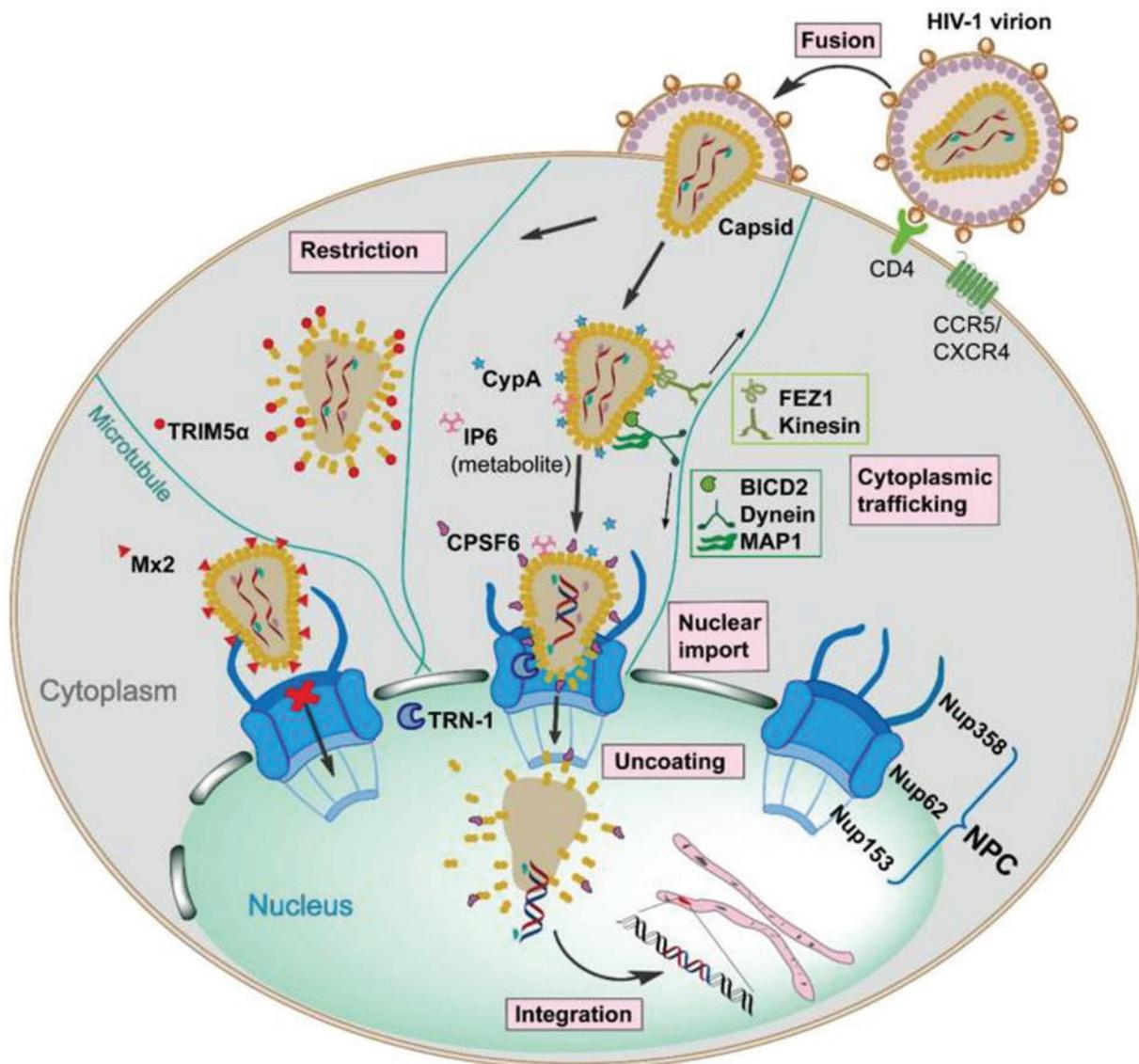


Figure 17 : Figure récapitulative des partenaires cellulaires de la capside du VIH-1. Les facteurs de restriction sont représentés en rouge, les protéines impliquées dans le transport moléculaire en vert. D'après (Zhuang et Torbett, 2021).

## H. Le désassemblage de la capside

Le désassemblage de la capside est une étape nécessaire pour l'insertion du génome viral dans le génome cellulaire. Or, les protéines de capside s'assemblent spontanément pour former la capside après la libération des sous-unités CA depuis le précurseur Gag. Le désassemblage apparaît donc comme un processus défavorable.

Plusieurs modèles de désassemblage ont été proposés (Campbell et Hope, 2015), suggérant un désassemblage dans le cytosol, au niveau des pores nucléaires ou dans le noyau (Figure 18).

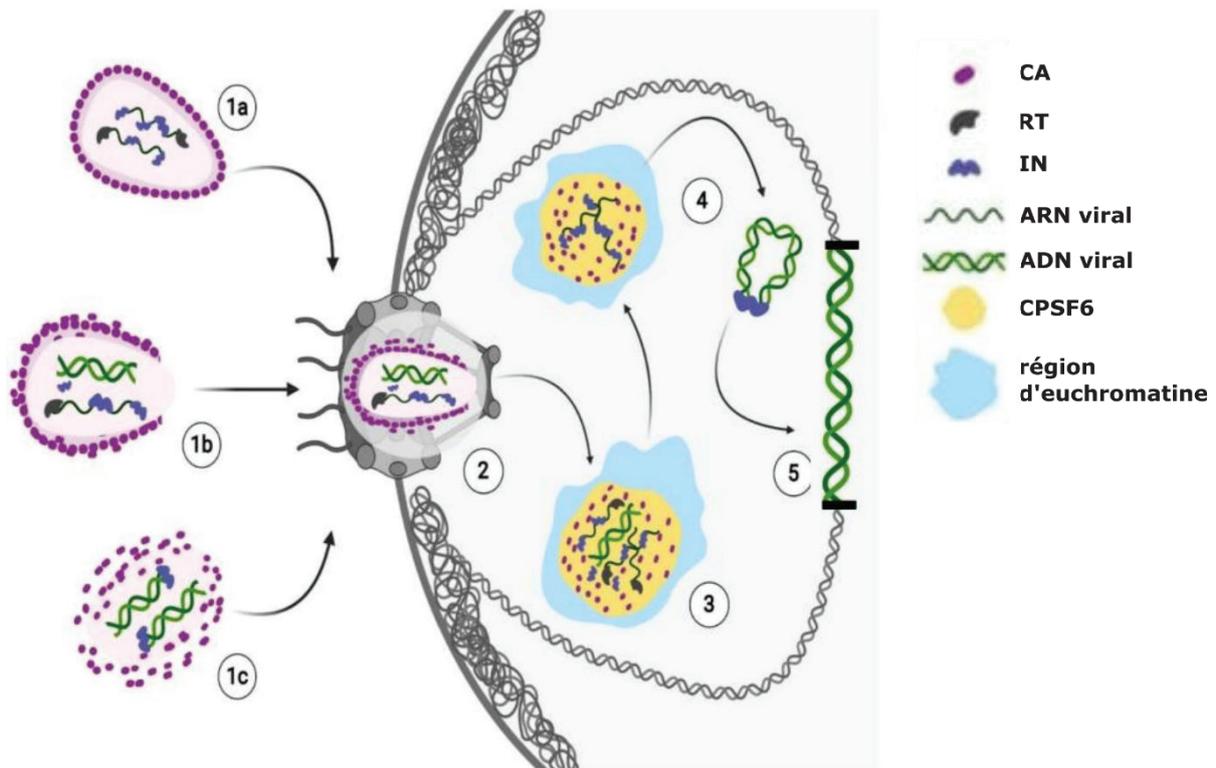


Figure 18 : Modèle de décapsulation du VIH-1 (d'après (Scoca et Di Nunzio, 2021)). La capside peut se trouver à différents états au niveau du pore nucléaire : 1a) intacte, 1b) réorganisée, 1c) partiellement désassemblée. Selon le modèle retenu, la rétrotranscription a alors lieu avant l'entrée dans le noyau (modèles 1b et 1c) ou après entrée par le pore nucléaire (modèle 1a). Le désassemblage complet se déroule dans le noyau, à proximité des régions d'euchromatine *via* les interactions des protéines de capsid avec CPSF6. L'intégration du génome viral se fait alors dans une région d'euchromatine.

Les travaux et publications les plus récents semblent en faveur d'un désassemblage à l'intérieur même du noyau, avec l'observation de capsides à l'intérieur du noyau (Bönisch *et al.*, 2020 ; Burdick *et al.*, 2020). Selon ce modèle, le génome est donc transporté à l'intérieur de la capsid, dans le noyau où la capsid se désassemble et libère *in situ* le génome viral.

La synthèse d'un brin d'ADN au cours de la rétrotranscription apparaît comme un événement nécessaire à l'initiation du désassemblage (Cosnefroy, Murray et Bishop, 2016 ; Rankovic *et al.*, 2017). Cela semble compatible avec les expériences suggérant que la rétrotranscription se déroulerait à l'intérieur du noyau (Mukherjee *et al.*, 2021). Ainsi, la production de l'ADN viral déstabilise la capsid, ce qui permet l'initiation du processus de désassemblage. Si le lieu de cette initiation du désassemblage reste encore débattu, le désassemblage complet se termine dans le noyau. Le génome viral est alors libéré au sein du noyau et délivré au voisinage de l'euchromatine, et l'intégrase virale catalyse son insertion dans le génome cellulaire.

## I. La capside comme cible thérapeutique

La capside du VIH-1 a été utilisée comme cible thérapeutique, ce qui a permis d'identifier de nombreuses molécules inhibitrices, bien qu'à ce jour, aucune n'ait passé la phase clinique (Thenin-Houssier et Valente, 2016). La molécule PF74 a été utilisée pour son affinité pour la capside du VIH-1 (Bhattacharya *et al.*, 2014 ; Blair *et al.*, 2010). Cette molécule se fixe sur l'ensemble des sous-unités au sein d'un hexamère, ce qui a pu être observé par cristallographie aux rayons X (Figure 19) (Blair *et al.*, 2010).

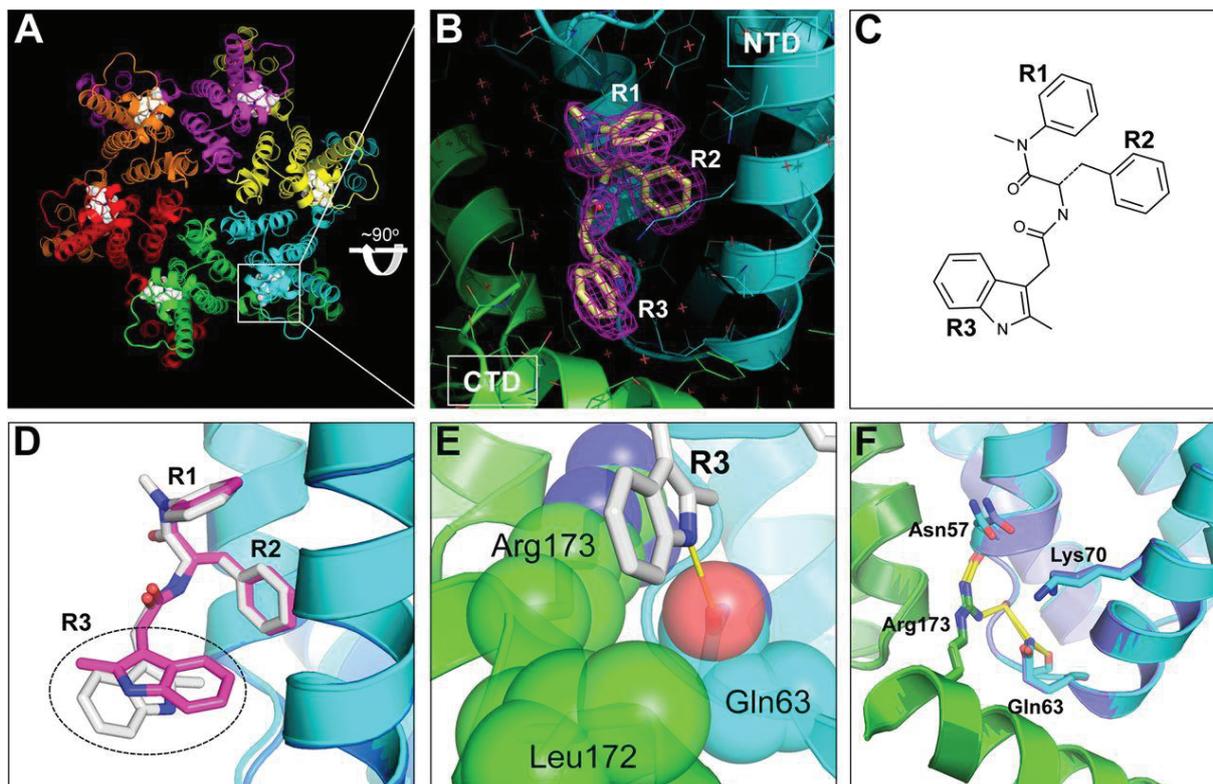


Figure 19 : Fixation de la molécule PF74 sur la protéine de capside du VIH-1. A) Vue de la fixation au sein de l'hexamère. B) Zoom sur la fixation au niveau d'une interface de multimérisation et carte de densité électronique du composé. C) Structure chimique de PF74. D), E) et F) Vue rapprochée de la fixation du composé et son interaction avec le domaine N-terminal d'une chaîne (en bleu) et le domaine C-terminal d'une autre chaîne (en vert) au sein de l'hexamère. D'après (Bhattacharya *et al.*, 2014).

PF74 se fixe spécifiquement sur les hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$ . Il interagit ainsi au niveau des interfaces de multimérisation de l'hexamère. La molécule est très efficace *in vitro* mais peu *in vivo*, probablement à cause d'une instabilité métabolique au sein de l'organisme (Link *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2021). Aussi, des dérivés de PF74 ont été testés dans le but d'identifier un composé au moins aussi affin et qui resterait à concentration efficace dans l'organisme plus longtemps. Le composé GS-6207 se fixe également sur la protéine VIH-1 sur les mêmes hélices et a une efficacité inhibitrice de la multiplication virale sur des cellules en culture  $EC_{50}$  inférieure à 1 nM (Link *et al.*, 2020).

D'autres molécules interagissent avec les protéines de capsidie mais avec des modes d'action différents. Nous allons discuter ici des autres moyens d'action sur la capsidie. À nouveau, les molécules testées contre le VIH-1 servent de modèle pour mettre en évidence d'autres stratégies d'interférence avec la protéine de capsidie du FIV.

La capsidie a plusieurs rôles dans le cycle viral du VIH-1. Les interactions entre les sous-unités p24 sont un des éléments déclencheurs du bourgeonnement à la membrane (voir la partie I.E, page 27). Les sous-unités p24 se réorganisent après le clivage de la polyprotéine Gag et forment alors la capsidie, une des étapes du processus de maturation du virus (voir partie I.F, page 33). Les particules virales immatures ne sont pas infectieuses (Martin, Salzwedel et Allaway, 2008). La capsidie protège le génome viral et est requise pour l'entrée du génome viral dans le noyau et son intégration dans le génome cellulaire (voir la partie I.G page 38). Aussi, plusieurs modes d'action sont possibles, selon le site ciblé.

Une possibilité d'action est d'inhiber la maturation de la capsidie. Une façon simple est d'utiliser des inhibiteurs de la protéase et cette approche a été très utile contre le VIH-1 (Konvalinka, Kräusslich et Müller, 2015 ; Sham *et al.*, 1998). Cependant, des mutations sur la protéase virale peuvent restreindre le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de la protéase (Rhee *et al.*, 2010). Une autre approche possible pour inhiber la maturation est de cibler la polyprotéine Gag et que le composé thérapeutique soit en compétition avec la protéase pour l'interaction avec Gag. Des inhibiteurs de la maturation se fixent sur la partie C-terminale de la protéine, au niveau de la liaison avec le peptide espaceur SP1, comme le Bevirimat (Gupta, Louis et Tycko, 2020 ; Martin, Salzwedel et Allaway, 2008). Ces composés empêchent la rupture des interactions au sein du bouquet à 6 hélices de la jonction CA-SP1, ce qui a pu être identifié par la RMN du solide (Gupta, Louis et Tycko, 2020). D'autres inhibiteurs de la maturation agissent de façon similaire en stabilisant ces faisceaux à 6 hélices (Ghimire *et al.*, 2021). Cette interaction empêche la protéase virale de cliver les précurseurs polyprotéiques Gag (Urano *et al.*, 2016).

D'autres sites de fixation sur la protéine de capsidie du VIH-1 ont été ciblés par des composés à but thérapeutique. La Figure 20 et la Figure 21 présentent plusieurs molécules interagissant avec la protéine de capsidie. Ces composés présentent des coefficients d'affinité  $K_D$  entre l'ordre du micromolaire voire du nanomolaire pour les plus affins (Wang *et al.*, 2020).

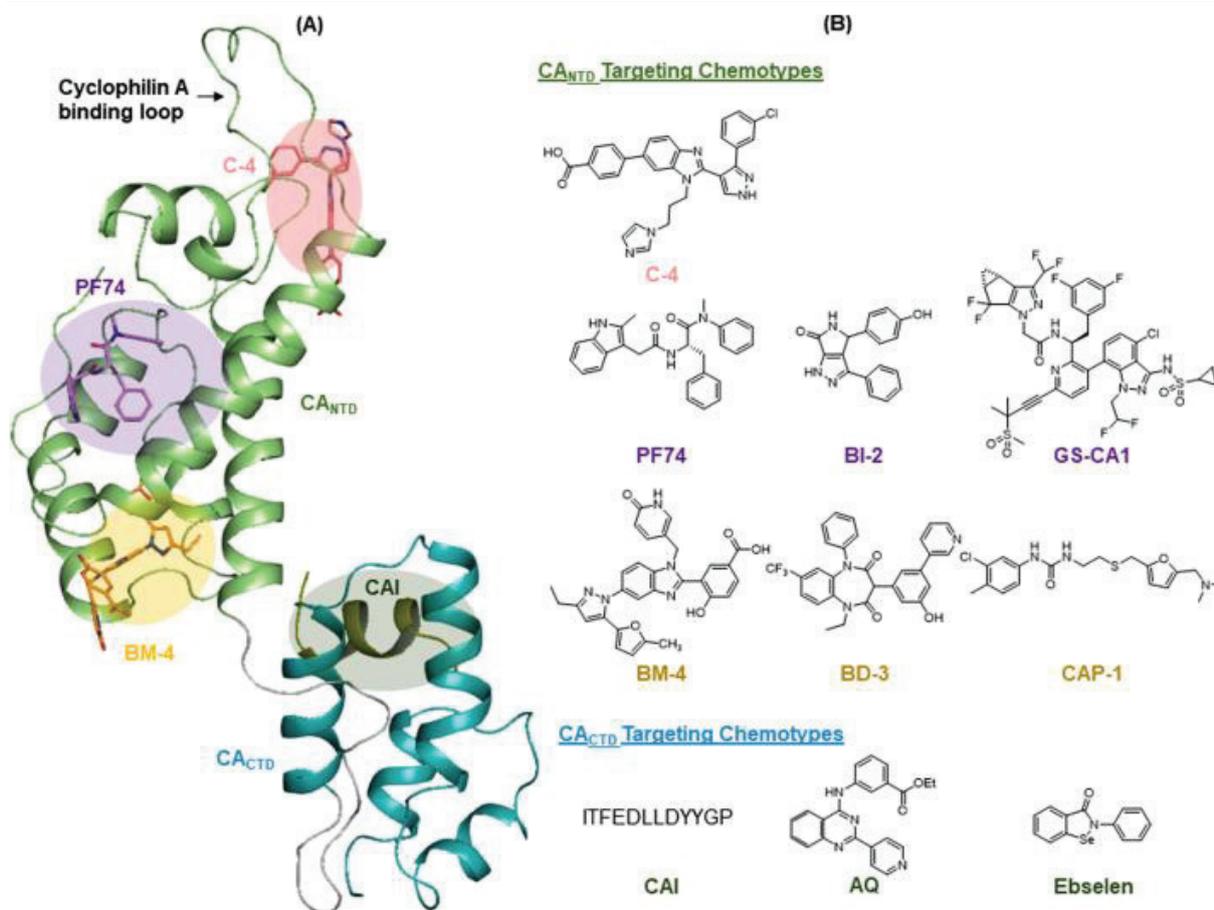


Figure 20 : Exemples de composés ciblant la protéine VIH-1 p24. Les molécules du panneau (B) dont le site de fixation est connu sont localisées sur le modèle structural de la protéine p24 (A), c'est-à-dire les molécules C-4, PF74 et BM-4 pour le domaine N-terminal, et CAI pour le domaine C-terminal. (D'après Wang *et al.*, 2020).

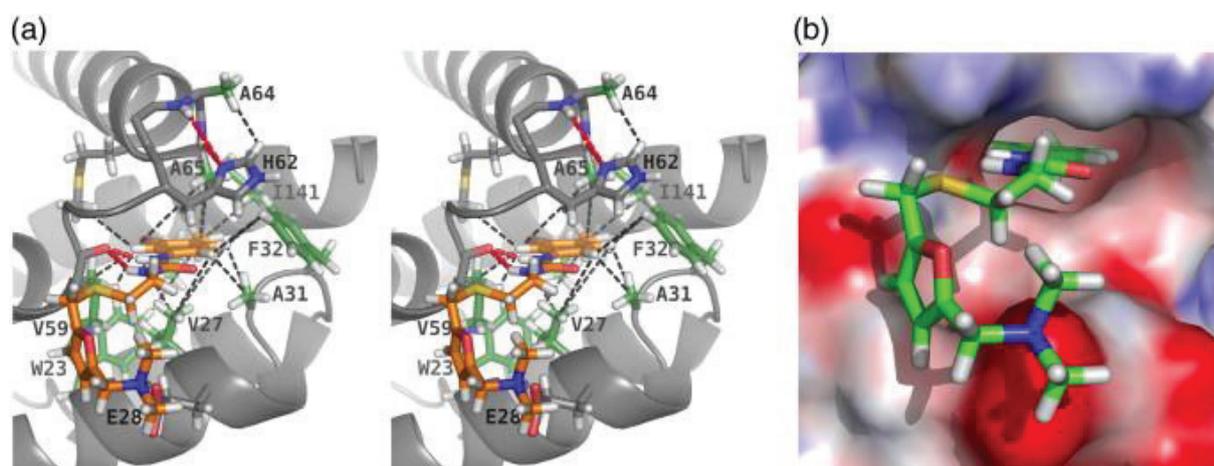


Figure 21 : Modèle d'interaction entre VIH-1 p24 et CAP-1. Les données structurales combinent des informations d'interactions identifiées par la RMN et des données cristallographiques. (Kelly *et al.*, 2007).

Parmi ces composés interagissant avec la protéine de capside du VIH-1, les composés CAI, CAP-1 et CAP-2, benzimidazoles (BM) et benzodiazépines (BD) inhibent l'assemblage de la capside *in vitro* (Sticht *et al.*, 2005 ; Tang *et al.*, 2003 ;

Thenin-Houssier et Valente, 2016). Le composé BI-2 déstabilise les capsides de VIH-1 (Fricke *et al.*, 2014).

Le composé CAI se lie sur le domaine C-terminal de la protéine VIH-1 p24, dans une poche délimitée par les hélices  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ . Un modèle structural suggère que CAI se fixe sur FIV p24 de façon similaire, sur le domaine C-terminal (Khwaja *et al.*, 2016). CAI induit la formation de dimères non fonctionnels pour l'assemblage. Les composés CAP-1 et CAP-2 se lient sur le domaine N-terminal comme GS-6207, mais sur un autre site (Figure 22).

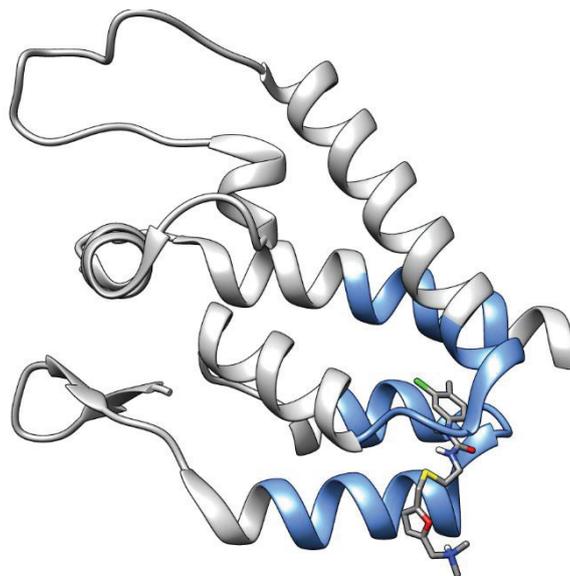


Figure 22 : Position du composé CAP-1 sur la protéine VIH-1 p24. La zone de fixation de la protéine est indiquée en bleu et implique les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$  et une partie des boucles flexibles avoisinantes (Kelly *et al.*, 2007 ; Kleinpeter et Freed, 2020).

Les composés CAP-1 et CAI inhibent l'assemblage en inhibant les réarrangements structuraux nécessaires pour la formation des hexamères (Kleinpeter et Freed, 2020). Le composé CAP-1 modifie la position des chaînes latérales de certains acides aminés, empêchant la stabilisation des formes oligomériques. Des composés à noyau benzimidazole présentent un mécanisme similaire à CAP-1 mais avec une efficacité supérieure (Kleinpeter et Freed, 2020). Ces composés ont une affinité supérieure pour la protéine à CAP-1.

Enfin, d'autres molécules se lient à la protéine VIH-1 p24 présentent un mécanisme tout autre comme la molécule 3G11 (Opp *et al.*, 2017). Cette molécule se fixe sur le domaine N-terminal de la protéine VIH-1 p24, dans une poche située entre les résidus V27 et G60. Ce ligand présente la particularité d'inhiber la rétrotranscription du génome viral. Cette étape se déroule en effet à l'intérieur de la capside. Le mécanisme d'inhibition de la rétrotranscription n'est pas décrit. Cette molécule est un inhibiteur non nucléosidique de la rétrotranscription ciblant la protéine de capside. Il est possible que l'import des dNTP dans la capside soit inhibé par la présence du composé, ou encore que la rétrotranscription nécessite

des réarrangements structuraux de la protéine de capsid, mais ces hypothèses restent à déterminer.

Aussi, la capsid du VIH-1 représente une cible thérapeutique d'intérêt *via* les multiples zones de fixation permettant d'interférer avec le cycle viral. Certaines interactions stabilisent la capsid, comme certaines molécules à noyau benzimidazole ou les composés CAP-1 et CAP-2. D'autres facilitent le désassemblage comme la molécule BI-2. D'autres molécules, comme le Bevirimat, se lient sur la protéine Gag avant maturation et empêche le clivage par la protéase virale (Thenin-Houssier et Valente, 2016). La molécule 3G11 est intéressante également par l'action qu'elle inhibe, la rétrotranscription, alors qu'elle interagit avec la protéine de capsid. La capsid virale assure ainsi de nombreux rôles pour la progression du cycle viral, grâce aux interactions avec les partenaires cellulaires, ou sa capacité à réaliser des réarrangements structuraux nécessaires pour l'import des dNTP et la rétrotranscription.

Au début de ma thèse, aucune molécule ciblant la capsid de FIV n'avait encore été décrite malgré son rôle clef dans le cycle viral du FIV. Or, des molécules visant la capsid du VIH-1 avaient été mises au point et étudiées. Nous nous sommes ainsi intéressés à la capsid du FIV comme cible thérapeutique et avons cherché à mettre en évidence des molécules d'intérêt thérapeutique interagissant spécifiquement avec cette dernière.

## J. Essais de traitements pour les infections à FIV

Les médicaments couramment utilisés pour traiter les infections au VIH ont été testés sur les infections à FIV pour tenter une approche de médicaments (Mohammadi et Bienzle, 2012), comme des inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques de la rétrotranscriptase et des inhibiteurs de la protéase ou de l'intégrase. Cependant, même si les deux virus appartiennent au même genre viral, les traitements contre le VIH n'ont pas montré d'effets sur les infections au FIV.

Des essais de vaccins ont été développés et dirigés contre la souche Petaluma du sous-type A et la souche Shizuoka du sous-type D du FIV (Fel-O-Vax® ; Figure 23) (Pu *et al.*, 2001 ; Uhl *et al.*, 2002). Cependant, si les anticorps développés sont neutralisants contre ces souches, l'immunité induite est peu efficace contre les autres souches circulantes (Hosie *et al.*, 2011).

En conséquence, l'efficacité du vaccin est variable en fonction des territoires et des souches y circulant. Ce vaccin a été mis sur le marché en 2002 aux États-Unis, au Japon, en Australie et en Nouvelle-Zélande (Hosie *et al.*, 2009). Son efficacité était estimée à 56% en Australie (Westman *et al.*, 2016 ; Sahay et Yamamoto, 2018), un territoire où le sous-type A du virus circule activement (Iwata et Holloway, 2008 ; Kann *et al.*, 2006) avec certaines zones à hauteur de 20% de chats infectés (Goldkamp *et al.*, 2008). Le vaccin est aussi décrit comme efficace contre certaines souches du sous-type B (Pu *et al.*, 2001), la souche MA-Bangston par exemple. Elle est cependant inefficace contre certaines souches du sous-type A comme la souche

UK8, et moins efficace contre des souches recombinantes entre sous-types A et B (Coleman *et al.*, 2014 ; Dunham, 2006). Enfin, les souches du sous-type B circulent également activement aux États-Unis, ce qui a diminué l'efficacité du vaccin sur le territoire (Pu *et al.*, 2001). Aujourd'hui, le vaccin n'est plus commercialisé aux États-Unis.

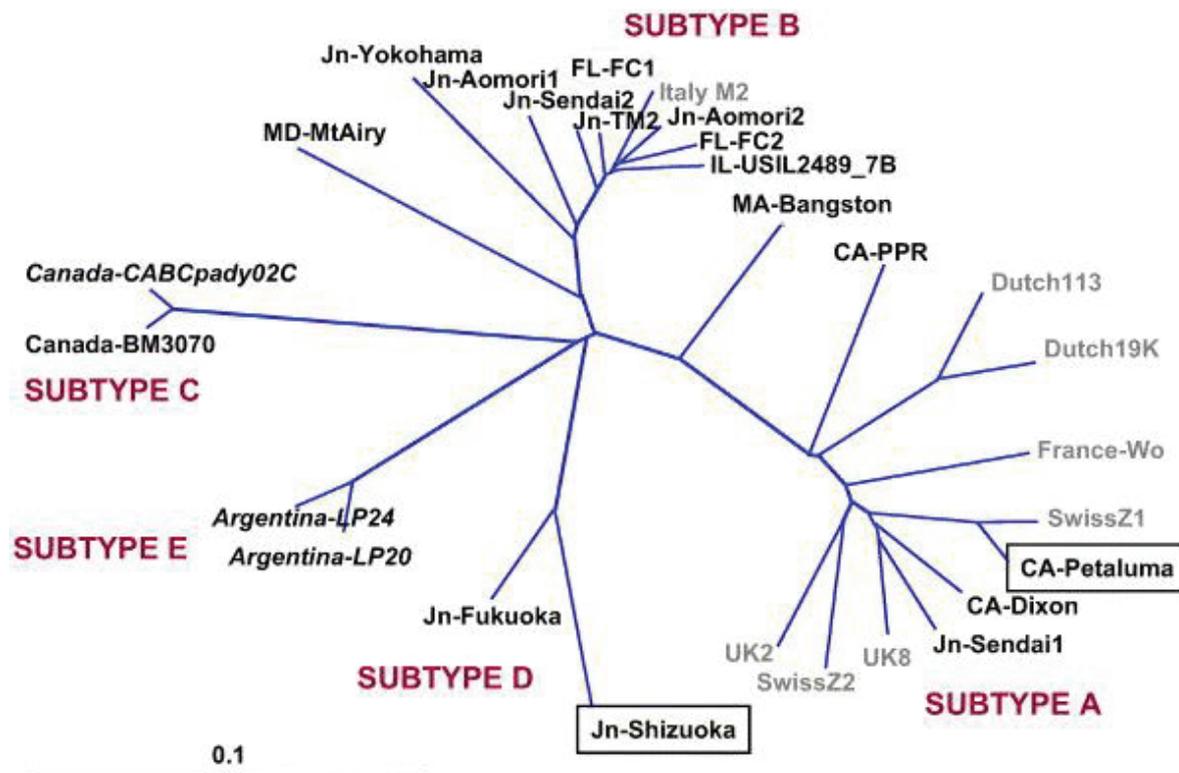


Figure 23 : Arbre phylogénétique de souches identifiées de FIV circulantes, basé sur la protéine Env. Les deux souches vaccinales utilisées pour le vaccin Fel-O-Vax® sont encadrées. Échelle en bas à gauche : nombre de substitutions d'acides aminés par site.

Aussi, la mise au point de traitements reste essentielle pour contrôler la progression virale chez les animaux infectés. Par ailleurs, le FIV représente un modèle potentiel des infections au VIH-1 et la mise au point de ces traitements pourrait amener à la mise au point de nouveaux composés efficaces pour les infections au VIH-1 (Elder *et al.*, 2010 ; Miller *et al.*, 2018).

## K. Développements de composés antiviraux *via* les approches structurales

La mise au point rationnelle de traitements requiert des connaissances structurales pour la compréhension des interactions entre la cible thérapeutique et des composés d'intérêt ou des partenaires de la cible, dont les interactions seraient alors intéressantes à inhiber. Cette approche a permis la mise au point de nombreux traitements anti-VIH-1, comme les inhibiteurs de la protéase virale

(Miller *et al.*, 1989) (entrée PDB 4HVP) en premier lieu, et par la suite des inhibiteurs de la fusion (Qi *et al.*, 2008) ou des approches ciblant la polyprotéine Gag et la maturation des virions (Bocanegra *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2013) ou les interactions entre la nucléocapside et l'ARNg (Goudreau *et al.*, 2013 ; Shvadchak *et al.*, 2018).

La résolution des structures des sous-unités Gag du VIH et de FIV représente ainsi une avancée majeure dans la mise au point des traitements ciblant ces sous-unités. À ce jour aucune structure atomique de la polyprotéine Gag entière n'a encore été résolue, mais uniquement des fragments. La maturation des virions requiert la libération des sous-unités depuis le précurseur et leur association en structures supramoléculaires. Aussi la connaissance des structures de chaque sous-unité reste une approche d'intérêt pour la mise au point de traitements.

Aussi, chez le VIH-1, les structures de la protéine de matrice p17 myristoylée (Tang *et al.*, 2004) ou non (Matthews *et al.*, 1995), des capsomères de p24 (Pornillos *et al.*, 2010), de la nucléocapside en interaction avec l'ARNg (Goudreau *et al.*, 2013) et des domaines espaceurs (Chen *et al.*, 2020 ; Schur *et al.*, 2016) ont été résolues. Des constructions de fragments englobant différentes sous-unités comme les fragments CANC ont également été résolues (Bharat *et al.*, 2014). Ces structures ont mis en évidence la flexibilité structurale au sein de la polyprotéine Gag au niveau des *linkers* et permis de mettre au point des molécules candidates comme inhibiteur de la maturation du VIH (Chen *et al.*, 2020). Enfin, un potentiel traitement inhibiteur du désassemblage de la capsid du VIH-1, dont la mise au point a été aidée par une approche structurale, est actuellement en essai thérapeutique (Bester *et al.*, 2020 ; Link *et al.*, 2020). Pour le FIV, la structure de la protéine de matrice p15 a également été caractérisée, par cristallographie (Serrière, Robert, *et al.*, 2013) puis par RMN (Brown *et al.*, 2015). La structure de la nucléocapside n'a pas été résolue. La protéine de capsid du FIV a été étudiée et une structure a été publiée (Folio *et al.*, 2017). L'objectif de cette thèse est d'identifier un ligand inhibiteur de la protéine, toujours à l'aide d'une approche structurale.

## L. État des lieux sur la caractérisation de la protéine de capsid du VIH-1

Les premières structures des hexamères de capsid du VIH-1 ont été obtenues grâce à la mutagenèse de p24 VIH-1 visant à induire des ponts disulfures inter-chaînes (mutations A14C/E45C ou A42C/T54C) ayant pour but de stabiliser les interactions entre monomères au sein des hexamères (Pornillos *et al.*, 2009, 2010). En effet, les observations de microscopie électronique à basse résolution (Ganser-Pornillos, Cheng et Yeager, 2007) ont permis d'établir des modèles de structures d'hexamères de p24 VIH-1 et d'identifier des paires d'acides aminés voisins susceptibles d'être suffisamment proches pour interagir (Figure 24). Les couples d'acides aminés les plus intéressants que les auteurs ont identifiés, notamment les deux couples A14C/E45C et A42C/T54C (Figure 24), sont situés en N-terminal, dans les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , chacune faisant contact avec l'autre hélice de la protéine voisine au sein de l'hexamère (Pornillos *et al.*, 2010).

Ces mutagenèses ont permis ainsi de stabiliser les formes hexamériques *via* les ponts disulfures inter-chaînes entre les cystéines qui ont été introduites. Ces préparations de protéines ont permis la caractérisation structurale des hexamères natifs (Pornillos *et al.*, 2010) ou en présence d'interactants, comme des fragments peptidiques de partenaires cellulaires, tel Nup153 (entrée PDB 4U0C (Price *et al.*, 2014)), l'inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) (entrée PDB 6ES8 (Mallery *et al.*, 2018)) ou encore le composé d'intérêt thérapeutique en cours d'essai clinique GS-6207 (entrée PDB 6V2F (Link *et al.*, 2020)).

Plus récemment, les structures hexamériques des protéines natives de capsid de certains rétrovirus ont pu être résolues par cristallographie, comme pour le *Bovine Leukemia Virus* (Obal *et al.*, 2015), par quelques mutations ponctuelles comme VIH-1 p24 P122A (Novikova *et al.*, 2018) ou en co-cristallisation avec des molécules liant VIH-1 p24 (Gres *et al.*, 2015),

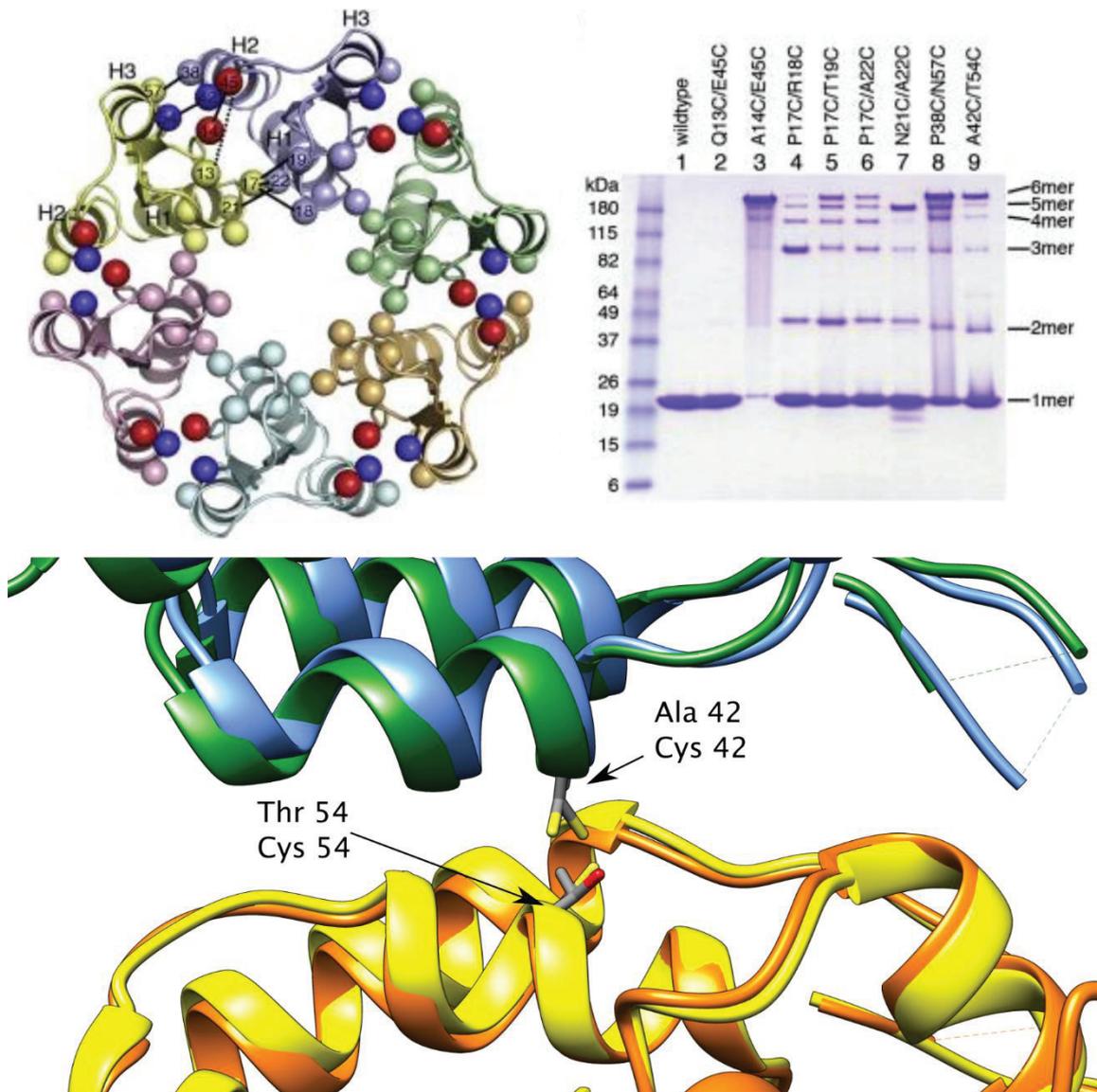


Figure 24 : Modèle atomique des hexamères de VIH-1 p24 depuis les observations en cryo-microscopie électronique (Ganser-Pornillos, Cheng et Yeager, 2007) ayant servi à l'identification de paires d'acides aminés proches entre deux chaînes peptidiques au sein de l'hexamère (Pornillos *et al.*, 2010). Les différentes paires, repérées par des boules de couleur identique dans la structure du panneau en haut à gauche, ont été mutées en cystéine pour permettre l'élaboration de ponts disulfures inter-chaînes et analysées sur SDS-PAGE non réducteur. Les différentes bandes correspondent au poids moléculaire attendu selon l'état d'oligomérisation jusqu'à l'hexamère. Panneau du bas : superposition des chaînes peptidiques depuis un hexamère stabilisé par les ponts disulfures C42-C54 (PDB 3MGE, (Pornillos *et al.*, 2010)) et un hexamère ne portant pas cette mutation (PDB 6AXR, (Novikova *et al.*, 2018)). Les chaînes peptidiques avec mutation A42C/T54C sont en orange et vert et les chaînes peptidiques sans cette mutation en jaune et bleu. Les acides aminés sont indiqués sur la structure.

### M. Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse est l'identification de molécules ciblant la capsid du virus de l'immunodéficience féline, pouvant aboutir à la mise au point de traitements potentiels. Cet objectif consiste en deux approches : d'une part, une

caractérisation structurale de la protéine pour les besoins du développement rationnel d'inhibiteurs et d'autre part, l'identification de ligand de la capsid et la caractérisation de cette interaction.

Cette deuxième approche a permis d'identifier une molécule candidate. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une molécule d'intérêt par sa capacité à interférer avec l'assemblage de la capsid et nous avons caractérisé son interface d'interaction avec la protéine par RMN. Cette molécule se fixe à un site spécifique, dont la comparaison avec la protéine de capsid du VIH-1 révèle l'intérêt thérapeutique majeur de ce site de fixation. Cette approche a requis des expériences de biologie structurale et d'interaction protéine:ligand.

La détermination de la structure des hexamères peut contribuer au développement rationnel de composés ciblant la capsid. Pour déterminer la structure d'un hexamère, et faciliter l'étude structurale de la protéine avec les composés identifiés préalablement, nous avons réalisé des mutagenèses de la protéine native pour stabiliser la protéine sous forme soluble et hexamérique comme ce qui avait été décrit pour le VIH-1. En effet, la résolution de la structure permettrait de caractériser plus précisément les interfaces d'oligomérisation de la capsid en vue de la mise au point de molécules bloquant l'assemblage d'une part, ou au contraire, stabilisant la capsid et inhibant son désassemblage. Enfin, la combinaison des deux approches, identification de composés et résolution de la structure, peut aider dans un sens à améliorer les composés identifiés ou, dans l'autre sens, à stabiliser la structure cristalline et donc, permettre la résolution de l'hexamère.

---

## II. Résultats

---

Les résultats se découpent en deux approches complémentaires. D'une part, l'objectif était de résoudre la structure cristallographique des hexamères de la protéine FIV p24 pour aider à la mise au point rationnelle de ligands d'intérêt thérapeutique. D'autre part, devant les difficultés à cristalliser la protéine, un criblage couplé à d'autres expériences structurales que la cristallographie a permis d'identifier un composé non optimisé. Les résultats sont présentés séparément.

### A. Essais de résolution de structure par une approche cristallographique

#### 1. Structure connue de la protéine de capsid p24 FIV

Une étude cristallographique de p24 FIV a été réalisée avant mon arrivée dans l'équipe sur une protéine tronquée de neuf résidus d'acides aminés en position C-terminale (p24  $\Delta$ CPT), car cette région était prédite comme flexible. La structure de la protéine de capsid du FIV a été résolue au préalable au sein de notre équipe (entrée PDB 5NA2 (Folio *et al.*, 2017)), sous une forme dimérique (Figure 25). Les quatre derniers acides aminés n'étaient pas visibles sur la carte de densité électronique, ce qui est compatible avec cette flexibilité attendue. Cependant, la forme dimérique obtenue est une forme artéfactuelle, avec les domaines N-terminaux en position opposée dans le dimère et n'interagissant pas ensemble, contrairement à l'hexamère des protéines VIH-1 p24. Les deux protéines sont reliées par un pont disulfure artéfactuel entre les cystéines 61 de chacun des monomères (Figure 25).

Cette cystéine 61 se situe dans une courte boucle exposée au solvant, entre les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4 de FIV p24. Pour la protéine VIH-1 p24, la boucle équivalente correspond à deux glycines consécutives et il n'y a pas de cystéine au voisinage de cette boucle (Pornillos *et al.*, 2010). VIH-1 p24 ne contient que deux cystéines, toutes deux localisées dans le domaine C-terminal (C198 et C218) et FIV p24 en contient quatre, deux dans le domaine N-terminal (C61 et C121) et deux dans le domaine C-terminal (C190 et C210).

Ainsi, la structure adoptée par FIV p24 au sein d'un hexamère n'a pas encore pu être résolue *via* des données expérimentales. En outre, les conformations adoptées par la boucle flexible entre les domaines N et C-terminaux diffèrent entre VIH-1 p24 et FIV p24 (Figure 25). Or, pour VIH-1 p24, la résolution de la structure de l'hexamère indique que cette conformation est cruciale pour le positionnement du domaine C-terminal, qui interagit avec le domaine N-terminal de la protéine voisine au sein d'un hexamère (Figure 25 (Pornillos, Ganser-Pornillos et Yeager, 2011)).

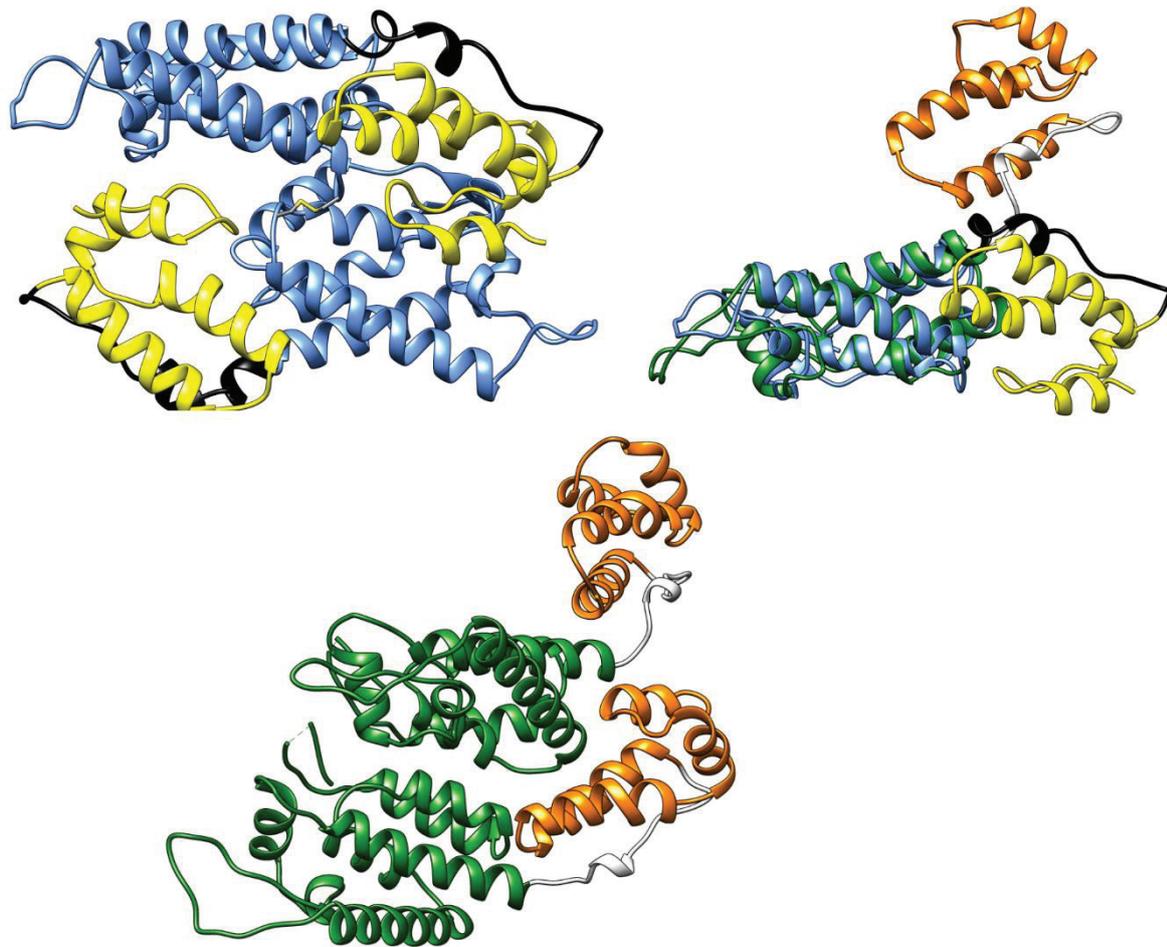


Figure 25 : Comparaison des structures résolues de FIV p24 et VIH-1 p24. Panneau en haut à gauche : orientation tête-bêche des deux sous-unités FIV p24 au sein du dimère, reliées par un pont disulfure. Panneau en haut à droite : superposition de FIV p24 au sein du dimère cristallographique et de VIH-1 p24 au sein de l'hexamère. Panneau du bas : interaction de deux chaînes peptidiques de VIH-1 p24 au sein de l'hexamère. Les boucles flexibles, domaines N-terminaux et C-terminaux de FIV p24 sont respectivement en noir, bleu et jaune et les boucles flexibles, domaines N- et C-terminaux de VIH-1 p24 respectivement en blanc, vert et orange. Entrées PDB 3MGE et 5NA2 (Folio *et al.*, 2017 ; Pornillos *et al.*, 2010).

La conformation adoptée par le monomère de FIV p24 dans la structure cristalline ne nous permet pas de modéliser l'assemblage hexamérique à cause de cette nécessité d'interaction entre les domaines des différentes protéines de l'assemblage. J'ai donc cherché à obtenir une structure cristalline d'un hexamère de FIV p24.

## 2. Cristallogénèse d'hexamères de FIV p24 $\Delta$ CPT natifs

La capsid du VIH-1 est donc formée d'hexamères et de pentamères de p24. On suppose que la même organisation est retrouvée dans la capsid du FIV. Il apparaît, d'après la structure dimérique résolue de FIV p24, que la protéine présente une flexibilité structurale au niveau de la boucle entre les deux domaines N- et C-terminaux. Cette flexibilité permet des réarrangements des positions

relatives des deux domaines de la protéine. Or, leur positionnement est crucial pour permettre la formation des hexamères, d'après ce qui est observé sur les structures des hexamères en pentamères de VIH-1 p24 résolues (Pornillos *et al.*, 2010). Il est donc nécessaire de résoudre la structure d'un hexamère ou pentamère de protéine FIV p24 à l'aide de données expérimentales.

Un des objectifs de cette thèse est donc d'identifier des conditions permettant de résoudre la structure des hexamères de FIV p24 par cristallographie aux rayons X. Dans un premier temps, une approche de cristallogénèse sur la protéine p24 $\Delta$ CPT native a été envisagée en testant différentes conditions. Cette approche avait par exemple permis la résolution de la structure des hexamères de protéine de capsid du virus leucémogène bovin (Obal *et al.*, 2015).

a) *Essais de cristallogénèse pour l'obtention d'hexamères*

Puisque la protéine p24FIV  $\Delta$ CPT a été cristallisée dans une condition du kit commercial PEG II (Qiagen), nous avons utilisé en priorité ce dernier. J'ai donc préparé différents échantillons de protéines en utilisant le même protocole de purification, mais à des concentrations différentes. L'ensemble correspond à environ 1 500 conditions différentes de cristallisation (Tableau 2). Dans ce criblage, seules trois conditions ont mené à des cristaux (conditions : protéine 10 mg.mL<sup>-1</sup> / kit PEG II – E11 ; protéine 10 mg.mL<sup>-1</sup> / PEG II G6 ; protéine 30 mg.mL<sup>-1</sup> / PEG II – D4) (Figure 26). Les différentes concentrations utilisées sont celles obtenues en sortie de l'étape de concentration après purification et varient donc selon le rendement de celle-ci. Les lots obtenus ont été testés immédiatement après purification pour la cristallisation. Sur ces trois conditions, deux étaient des cristaux de sel après diffraction aux rayons X et pour une condition (PEG II-E11), le cristal obtenu a été perdu lors de sa pêche et n'a donc pas été testé. Il n'a jamais pu être reproduit.

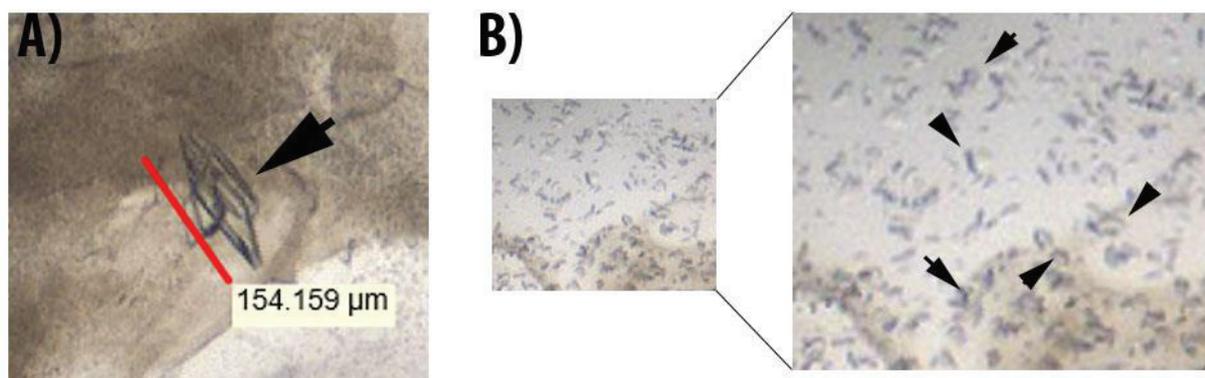


Figure 26 : Résultats de cristallogénèse de la protéine p24FIV  $\Delta$ CPT. A) Cristaux obtenus avec la protéine à 10 mg.mL<sup>-1</sup> et le kit PEG II, condition E11. La barre d'échelle indique la taille du cristal principal de la goutte. B) Mini-cristaux (10 mg.mL<sup>-1</sup> / PEG II-G6). Le panneau de gauche est à la même échelle que A). Les flèches indiquent le ou les principaux cristaux des conditions.

Tableau 2 : Essais de cristallogenèse de la protéine p24  $\Delta$ CPT. La colonne de gauche récapitule la concentration du lot de protéine, et la ligne supérieure les différents kits commerciaux utilisés.

		PEG I	PEG II	CS	Pact I	MPD
p24 HEPES pH 6,8	10 mg.mL <sup>-1</sup>	x	x	x		
	19 mg.mL <sup>-1</sup>	x	x		x	
	23 mg.mL <sup>-1</sup>	x	x		x	
	27 mg.mL <sup>-1</sup>	x	x			
	30 mg.mL <sup>-1</sup>		x			
	33 mg.mL <sup>-1</sup>			x		x
	34 mg.mL <sup>-1</sup>					x

*b) Augmentation des rendements d'expression et de purification*

Pour essayer d'augmenter les rendements de purification obtenus par les purifications par gravité sur résine Ni-TED, j'ai développé un protocole de purification en chromatographie liquide pour la préparation des protéines (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) sur un système FPLC Äkta Pure en utilisant une résine d'affinité cobalt pour l'étiquette poly-histidine.

L'élution de la chromatographie d'affinité était impure (Figure 27). Une seconde étape de purification était donc nécessaire. Nous avons alors envisagé la chromatographie d'échange d'anions. En effet, le point isoélectrique théorique de la protéine est de 5,4 (calculé par le logiciel en ligne ProtParam depuis la séquence de la protéine (Duvaud *et al.*, 2021)). Au pH de 7,4 utilisé pour la chromatographie d'affinité, la protéine p24 est majoritairement anionique.

Cependant, l'élution de la chromatographie d'affinité a été réalisée dans un tampon contenant une forte salinité (NaCl 300 mM, imidazole 150 mM), incompatible avec la chromatographie d'échange d'ions. Il est donc nécessaire de réaliser un changement de tampon contre un tampon peu salin, à pH 7,4 pour que la protéine soit chargée négativement. L'élution a été injectée sur une colonne de dessalage HiPrep Desalting 26/10 équilibrée dans un tampon NaPi 7,4 50 mM, NaCl 50 mM (tampon d'injection et de lavage de la chromatographie d'échange d'anions). L'élution de cette chromatographie a ensuite été injectée sur une colonne d'échange d'anion HiTrap Q. Après injection de l'échantillon, la colonne a été lavée contre 5 mL de tampon de lavage puis l'élution a été réalisée en gradient, jusqu'à

100 % de tampon  $\text{NaPi}$  pH 7,4 50 mM, NaCl 1 M (Figure 27). Au bout de cette dernière chromatographie, l'échantillon obtenu était pur ou quasi-pur. Considérant que l'éluion se produit à environ 40 % de tampon d'éluion, cet échantillon contient alors environ 400 mM de NaCl. Puis, en fonction des besoins d'utilisation de l'échantillon après cette préparation, il faut éventuellement réaliser un changement de tampon contre le tampon adéquat de destination.

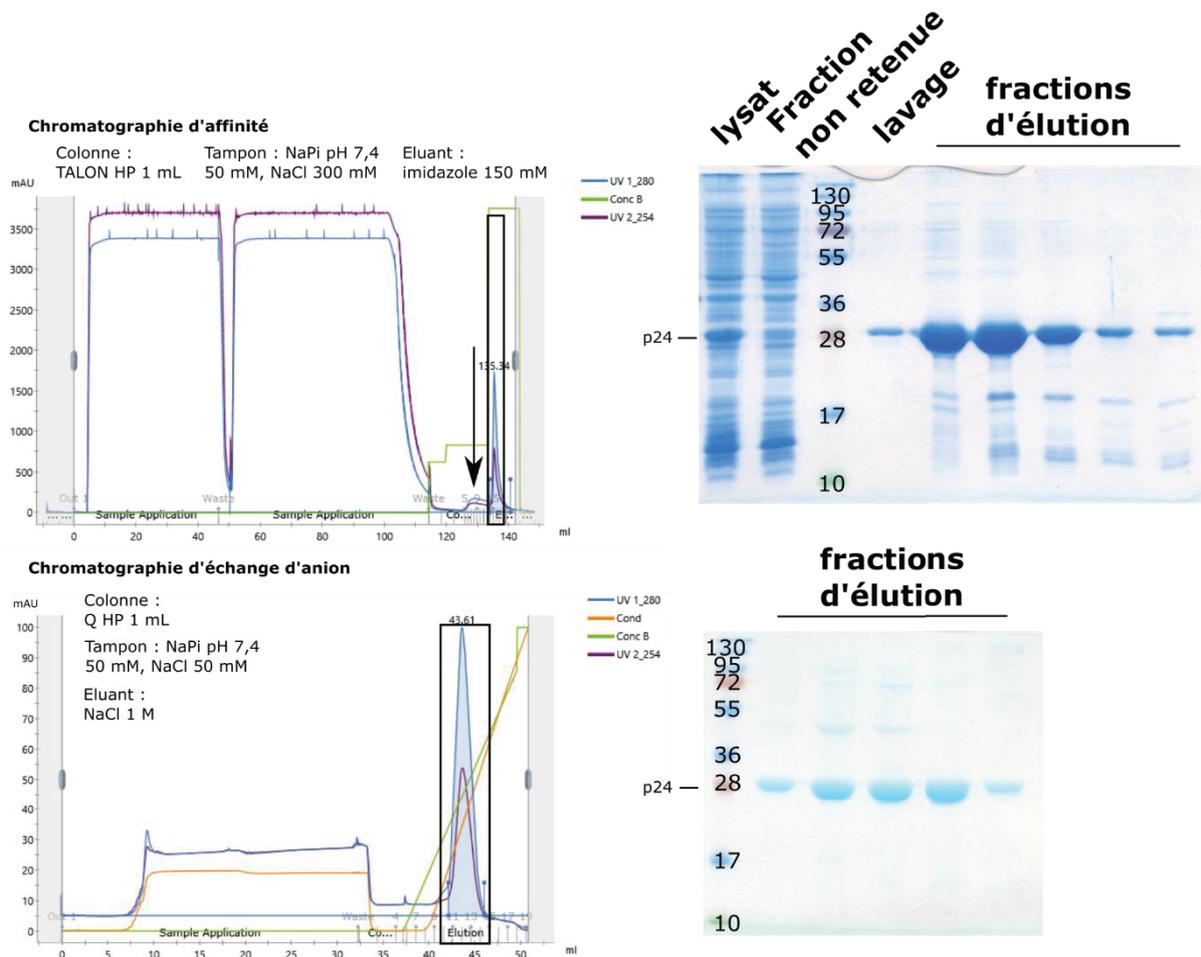


Figure 27 : Purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT par chromatographies d'affinité et d'échange d'anion. Panneau du haut : chromatographie d'affinité (étiquette poly-histidine). Le gel SDS-PAGE présente l'analyse des fractions injectées, non retenues, des fractions de lavage et d'éluion. La flèche sur le chromatogramme indique la fraction de lavage analysée et l'encadrement la position de l'ensemble des fractions d'éluion déposées. Panneau du bas : chromatographie d'échange d'anion. L'encadrement indique les fractions d'éluion déposées sur SDS-PAGE.

Ce système de purification permet une semi-automatisation du protocole. Cependant, le besoin de réaliser deux chromatographies de purification avec une

chromatographie de dessalage entre les deux diminue les rendements à cause des pertes de matière à chaque étape.

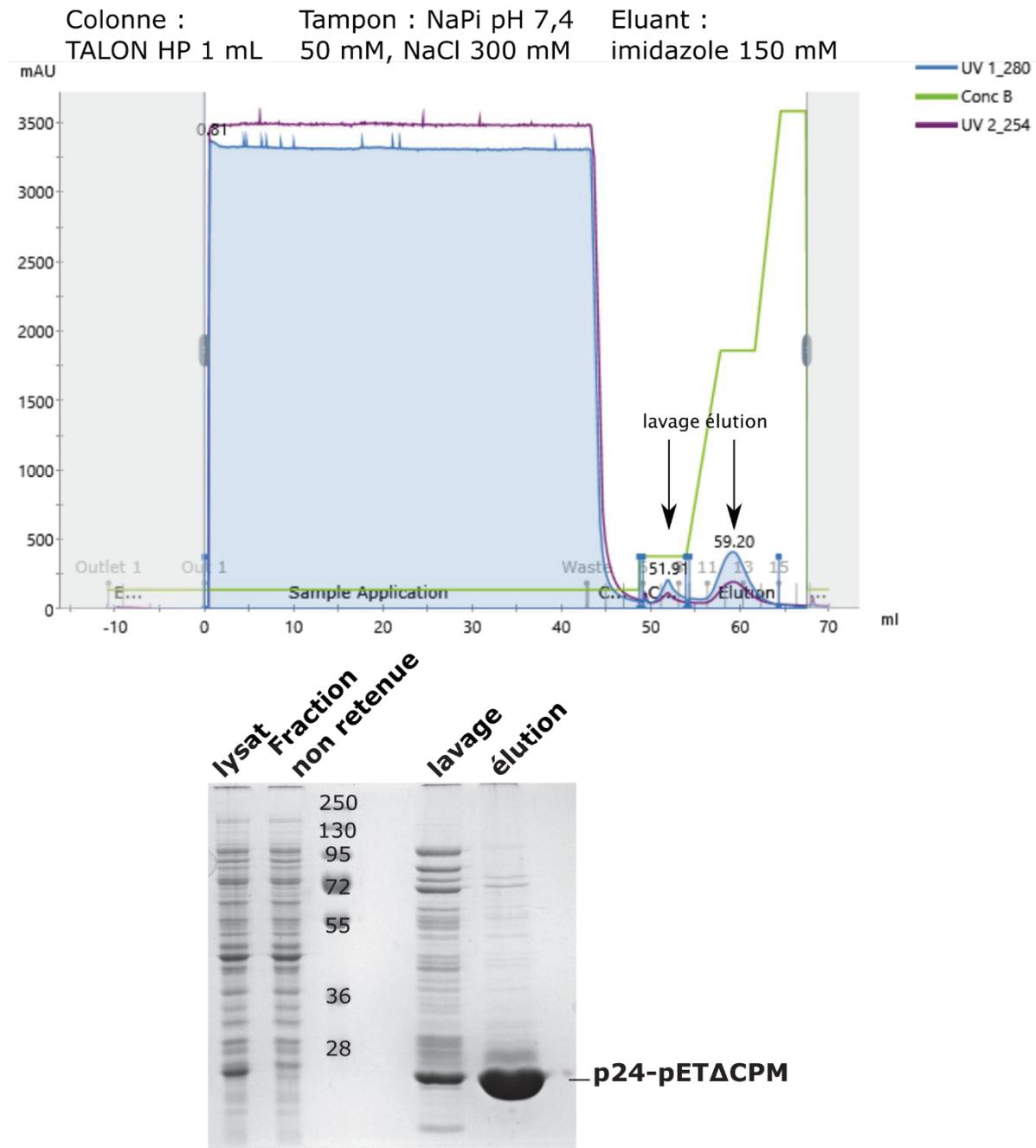


Figure 28 : Purification de la protéine p24-pET $\Delta$ CPM exprimée *via* le vecteur pET28(a) avec l'étiquette de purification en C-terminale. Panneau du haut : chromatogramme de purification par affinité pour le cobalt sur Äkta. Les flèches indiquent les fractions de lavage et d'élution déposées sur gel. Panneau du bas : SDS-PAGE des fractions de lyse, fraction non retenue, fraction de lavage et d'élution.

Pour tenter d'augmenter les rendements finaux de protéines, j'ai réalisé le clonage de la protéine dans un autre vecteur d'expression, le plasmide pET28(a), permettant également une expression en système bactérien et expression induite de la même façon par l'IPTG. Ce vecteur n'a cependant pas les mêmes séquences

régulatrices de son nombre de copies par cellule et l'étiquette qu'il fournit est en position C-terminale, ce qui est susceptible de faire varier les rendements d'expression et de purification. Le clonage de la protéine a été réalisé par PCR depuis le vecteur pRSET-B p24FIV  $\Delta$ CPT. La thréonine 1 de la construction p24  $\Delta$ CPT a ainsi été mutée en méthionine pour l'initiation de la traduction et l'étiquette de purification rajoutée en position C-terminale. Comme la construction porte la délétion des derniers acides aminés et la mutation de la proline 1 (depuis la séquence FIV p24 Petaluma), on appelle cette construction la construction p24-pET $\Delta$ CPM. La protéine est purifiée ensuite par FPLC avec une seule étape de purification, par affinité pour le cobalt (Figure 28). La protéine est relativement pure, avec une bande majoritaire correspondant à la taille de la protéine attendue, et les contaminants sont négligeables devant l'intensité de la bande.

Les rendements d'expression obtenus lors de l'utilisation de ce vecteur sont supérieurs, pouvant fournir jusqu'à 10 mg de protéine par purification depuis 2 L de culture, contre 1 à 5 mg de protéine depuis 2 L de culture pour la construction en pRSET-B. Les fractions d'élution ont pu être concentrées jusqu'à 100 mg.mL<sup>-1</sup> (4 mM) pour certains tests de cristallogénèse, ce qui a été rendu possible par l'augmentation des rendements de production et de purification.

Cette protéine recombinante p24 – pET $\Delta$ CPM a permis de tester de nombreuses conditions de cristallisation, avec différents kits commerciaux, des pH et des concentrations protéiques distinctes. Plus de 2 000 conditions ont ainsi pu être testées (Tableau 3). Quelques cristaux ont été obtenus (conditions PEG II – C11 / protéine 19 mg.mL<sup>-1</sup> dans 50 mM NaCl ; JCSG+ - E3 / 19 mg.mL<sup>-1</sup>, MbClassII – B5 / 40 mg.mL<sup>-1</sup>). En revanche, ces cristaux étaient également des cristaux de sel.

Il est cependant possible que cette construction ne soit pas pertinente. En effet, la méthionine à la place de la proline initialement présente dans la protéine sauvage, ou de la thréonine dans la construction  $\Delta$ CPT, est susceptible d'augmenter l'encombrement stérique, ce qui risque de changer le repliement du brin  $\beta$  initial. D'autre part, l'étiquette de purification est située sur la partie C-terminale. Cette étiquette rajoute donc un désordre dans une région prédite comme flexible. Il est impossible à ce stade de savoir si ces inconvénients peuvent poser des problèmes et une caractérisation biochimique de cette protéine pourrait répondre à cette question. Cette construction présente l'avantage d'être simple à purifier et de permettre une plus forte expression de la protéine, et ainsi d'avoir des quantités suffisantes pour cette caractérisation.

Tableau 3 : Essais de cristallogénèse de la protéine p24-pETΔCPM. Les protéines sont stockées dans un tampon dont le pH est précisé dans la colonne de gauche (pH 8 : Tris 50 mM ; pH 7,4 : HEPES 50 mM ; pH 6 et pH 6,8 : Bis-Tris 50 mM). En absence de contre-indication, les tampons de stockage contiennent 50 mM de NaCl.

		PEG I	PEG II	CS	Natrix	MB Class II	JCSG+	AmSO4	BCS
HEPES pH 7,4	19 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM	x	x		x		x		x
	19 mg.mL <sup>-1</sup> , NaCl 500 mM	x	x		x		x		x
Bis- Tris pH 6,8	28 mg.mL <sup>-1</sup> , DTT 3 mM, NaCl 50 mM		x	x					
Bis- Tris pH 6,8	30 mg.mL <sup>-1</sup> , NaCl 300 mM	x	x	x					
Tris pH 8	40 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM			x		x		x	
Bis- Tris pH 6	100 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM	x	x						
Tris pH 8	10 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM					x		x	

### 3. Formation de ponts disulfures pour la stabilisation de la capsid

#### a) Rappel du principe

Les premières structures publiées de capsid du VIH-1 ont été obtenues *via* des protéines mutées, permettant une stabilisation des hexamères. Les protéines produites portaient des substitutions d'acides aminés proches dans la structure par des cystéines pour permettre la formation des ponts disulfures et ainsi stabiliser les hexamères. Les principaux couples de mutations ayant donné des résultats sont les deux couples A42C/T54C et A14C/E45C. Ces protéines mutantes ont permis la caractérisation des structures des hexamères seuls, en interaction avec des composés (GS-6207, IP<sub>6</sub>) ou des partenaires cellulaires (hNup153) (Mallery *et al.*, 2018 ; Pornillos *et al.*, 2010 ; Price *et al.*, 2014).

#### b) Identification des cibles de mutagenèse pour la stabilisation des oligomères de FIV p24

Pour reproduire cette stratégie, nous avons réalisé une superposition du domaine N-terminal de VIH-1 p24 mutée avec ces cystéines, A42C/T54C et A14C/E45C avec celui de FIV p24 (Figure 29). Nous avons utilisé cette superposition afin d'identifier les positions équivalentes aux doubles mutants A42C/T54C et A14C/E45C de VIH-1 sur la structure de FIV p24, en faisant l'hypothèse que les surfaces d'interaction

sont conservées entre VIH et FIV. Les deux couples correspondants dans p24FIV sont donc d'une part A41C/T53C et d'autre part A13C/A44C.

Une mutagenèse dirigée sur la protéine p24 de FIV a donc été effectuée et a mené à la construction de deux plasmides, l'un codant la protéine mutante p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C et l'autre la protéine mutante p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C. Le mutant A41C/T53C nous a paru d'intérêt puisque les deux acides aminés substitués, alanine et thréonine, sont conservés entre les deux protéines FIV et VIH-1 p24. Dans l'hypothèse d'une conservation des interfaces d'interaction entre les deux virus reproduire le même couple de mutation dans FIV semblait avoir des chances de réussite.

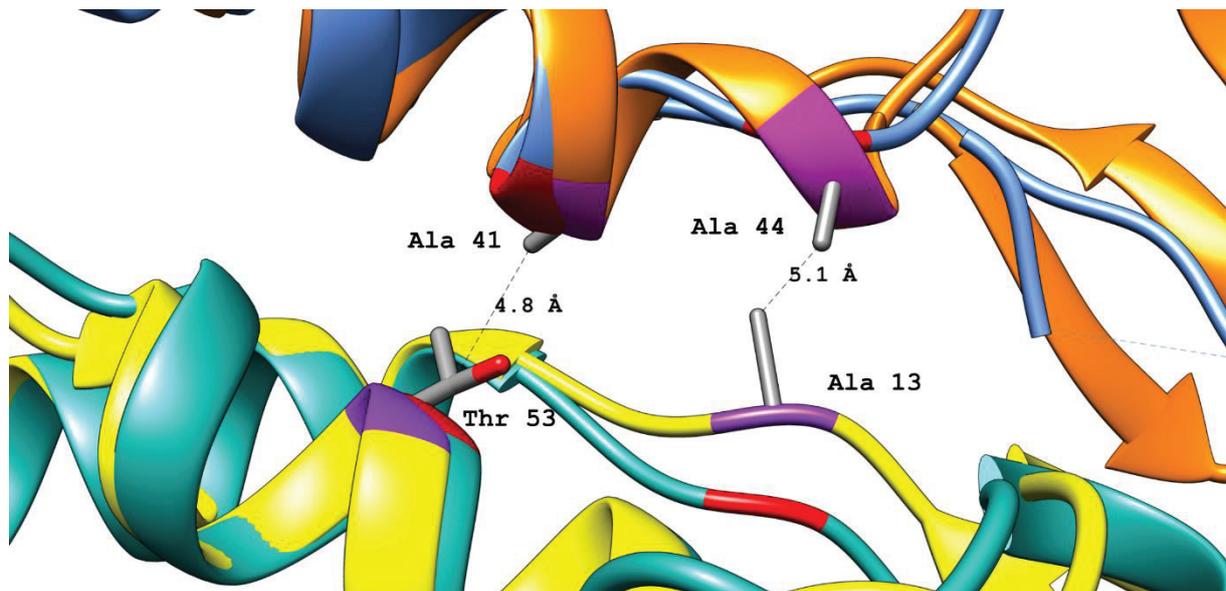


Figure 29 : Identification des acides aminés de FIV p24 à substituer contre des cystéines par alignement de structure avec les protéines VIH-1 p24 stabilisées par les mutations contre des cystéines. Les structures atomiques de l'hexamère de VIH-1 p24 (entrée PDB 3MGE (Pornillos *et al.*, 2010), chaînes peptidiques bleue et verte) ont servi de modèle pour positionner les domaines N-terminaux de FIV p24 (chaînes peptidiques orange et jaune) par superposition. Les deux paires d'acides aminés identifiés sur VIH-1 p24, A14C/E45C et A42C/T54C (position sur la chaîne peptidique en rouge) se superposent avec les paires de FIV p24 A13C/A44C et A41C/T53C (position sur la chaîne peptidique en violet).

Comme l'objectif était la réalisation de ponts disulfures, j'ai utilisé des souches bactériennes d'expression de protéines compatibles avec leur formation dans le cytosol. La souche utilisée, la SHuffle T7 Express de New England Biolabs, contient de nombreuses délétions dans les enzymes impliquées dans les systèmes d'oxydo-réduction cytosoliques et ne réduit pas les ponts disulfures formés. Elle exprime également des enzymes d'isomérisation des ponts permettant l'obtention des ponts disulfures les plus stables.

J'ai testé l'expression de p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C en souche SHuffle T7 Express dans un premier temps et réalisé une première purification par gravité selon le protocole usuel (Folio *et al.*, 2017 ; Serrière, Fenel, *et al.*, 2013) (Figure 30). Aucune

différence notable n'apparaît entre les gels réducteurs et non réducteurs. Cela signifie qu'aucun pont disulfure ne s'est formé au cours de l'expression. En absence de système de contrôle, il est encore impossible de savoir si cela signifie que les acides aminés choisis ne sont pas propices à la formation des ponts disulfures, ou si le système de formation de ces ponts n'est simplement pas optimal dans notre cas. Par ailleurs, la croissance bactérienne est fortement ralentie à cause des mutations du système d'oxydo-réduction cytosolique des bactéries, rallongeant les phases de croissance, d'expression et diminuant fortement les rendements de biomasse finaux.

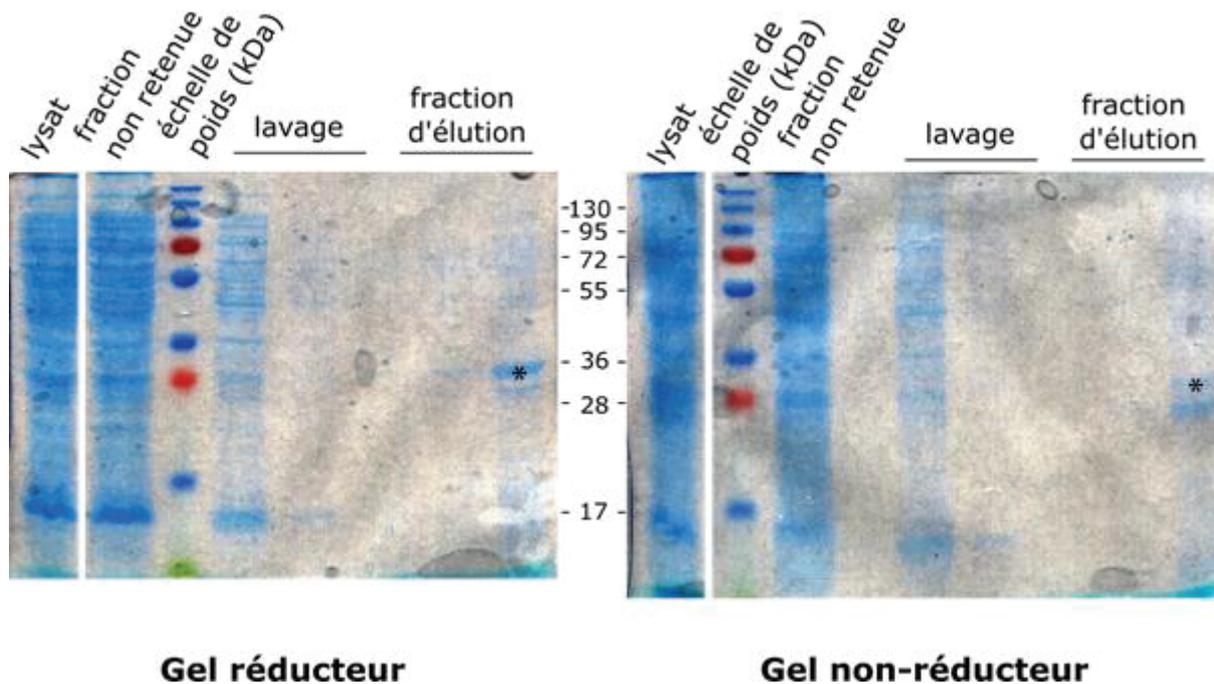


Figure 30 : Expression et purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C en souche bactérienne SHuffle T7 Express. Les échantillons de lysat, fraction non retenue sur chromatographie en batch, lavage et d'éluée ont été analysés en SDS-PAGE réducteur et non réducteur. Les bandes d'intérêt sont repérées par des astérisques.

L'expression en SHuffle est ainsi davantage une contrainte qu'un outil pour l'obtention des ponts disulfures attendus. En conséquence, pour les expressions suivantes, j'ai repris le protocole classique d'expression en souche T7 Express, comme décrit préalablement. Puisque la mise au point du protocole de purification en chromatographie liquide par chromatographie d'affinité suivie d'échange d'anion (voir page 56) s'est faite en parallèle de la réalisation de la mutagenèse, j'ai utilisé ce protocole de purification FPLC pour les deux protéines mutantes p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C et p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C.

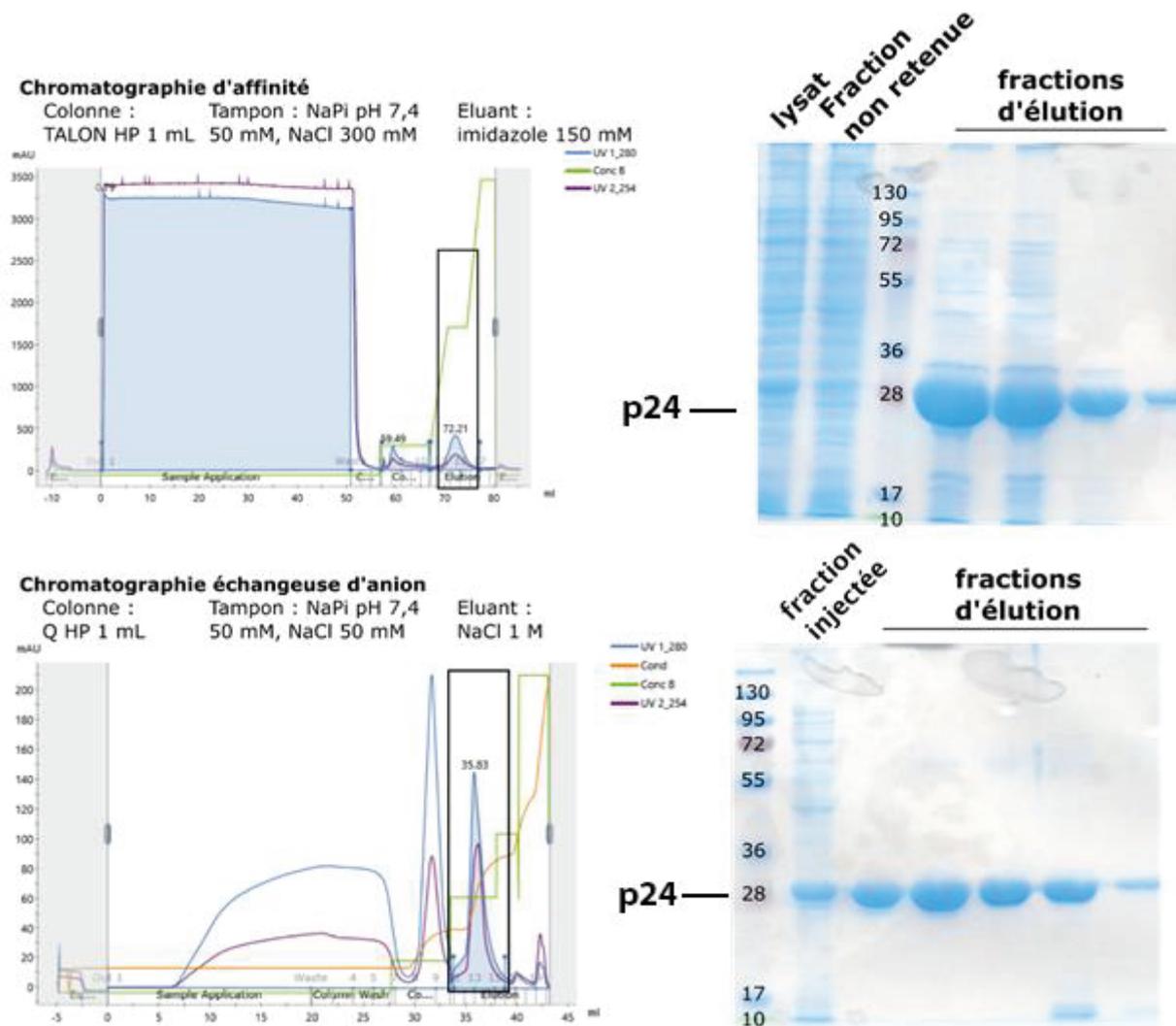


Figure 31 : Purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C par chromatographie FPLC. Panneau du haut : chromatographie d'affinité pour le cobalt et analyse sur SDS-PAGE des fractions de lysat bactérien et des fractions d'élu. Les fractions d'élu ont été réunies et injectées sur colonne échangeuse d'anion pour une seconde étape de chromatographie (panneau du bas). Les fractions d'élu ont été analysées sur SDS-PAGE. Les encadrés indiquent les fractions d'élu déposées sur chaque gel.

La protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C a été purifiée par chromatographie d'affinité pour le métal puis chromatographie échangeuse d'anion, après expression en souche T7 Express (Figure 31). L'élu de la première chromatographie comportait des contaminants. La protéine a été dessalée sur colonne de dessalement comme précédemment. La chromatographie d'échange d'anion a permis d'obtenir des fractions pures. L'étiquette de purification a ensuite été coupée par clivage protéolytique et retirée de la solution par chromatographie.

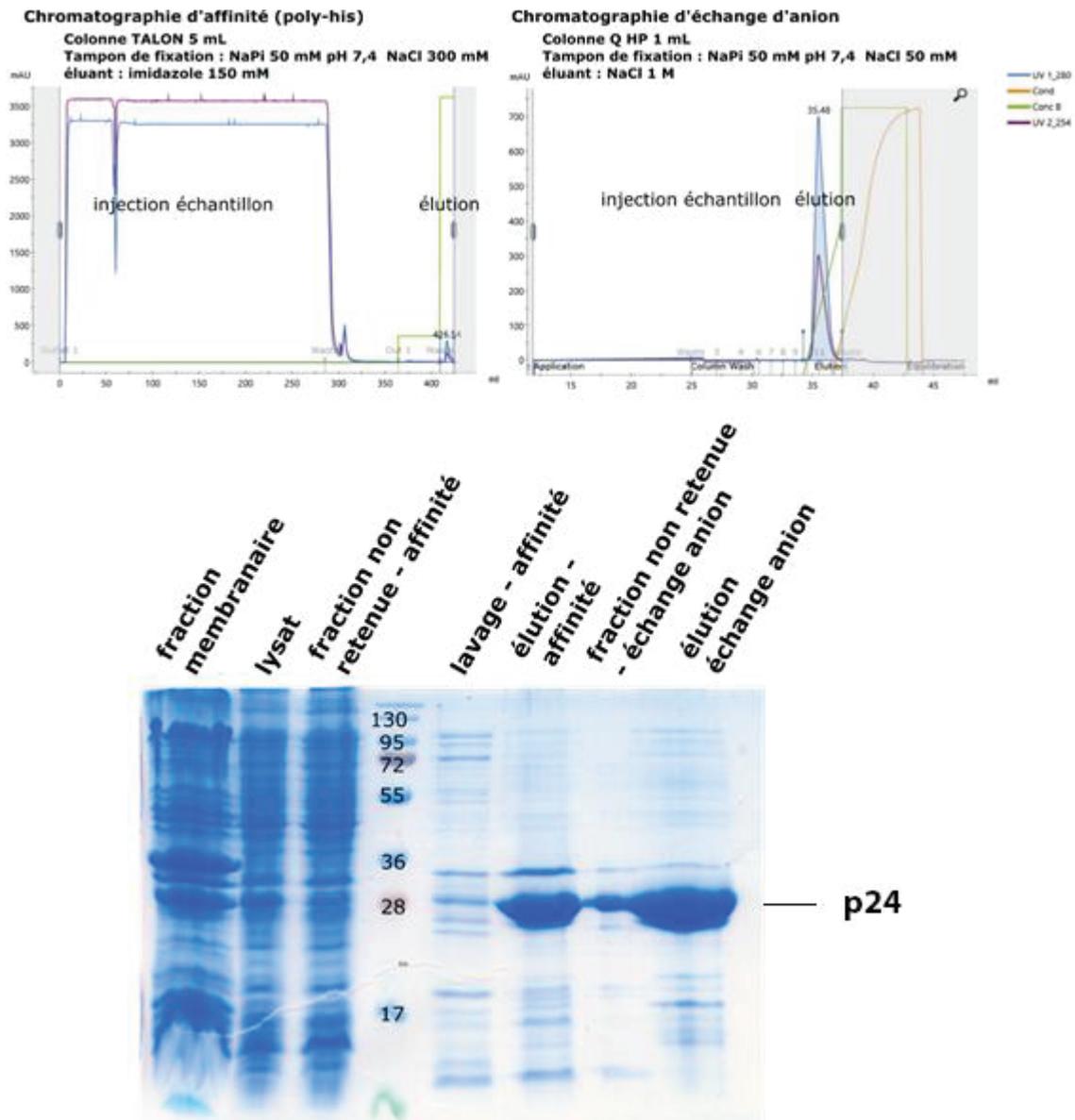


Figure 32 : Purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C par chromatographies successives d'affinité et d'échangeuse d'anion. Les fractions non retenues, fractions de lavage et d'élution de chacune ont été déposées sur SDS-PAGE.

La protéine p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C a été également purifiée par chromatographie d'affinité pour le métal puis chromatographie échangeuse d'anion (Figure 32). L'élution de la première chromatographie comportait des contaminants. La deuxième étape a éliminé certaines bandes de contaminants et permis de concentrer un peu l'échantillon. L'élution de la dernière étape de chromatographie présente toujours des contaminants, mais ils sont minoritaires par rapport à l'intensité de la bande de la protéine p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C. De la même façon que pour la protéine p24  $\Delta$ CPT, l'étiquette de purification a pu être retirée selon le même protocole (Figure 33). L'élimination de l'étiquette de la solution se fait par l'utilisation d'une résine Ni-NTA, sur laquelle les contaminants à affinité pour le métal peuvent également s'adsorber, ce qui a permis d'obtenir un échantillon pur.

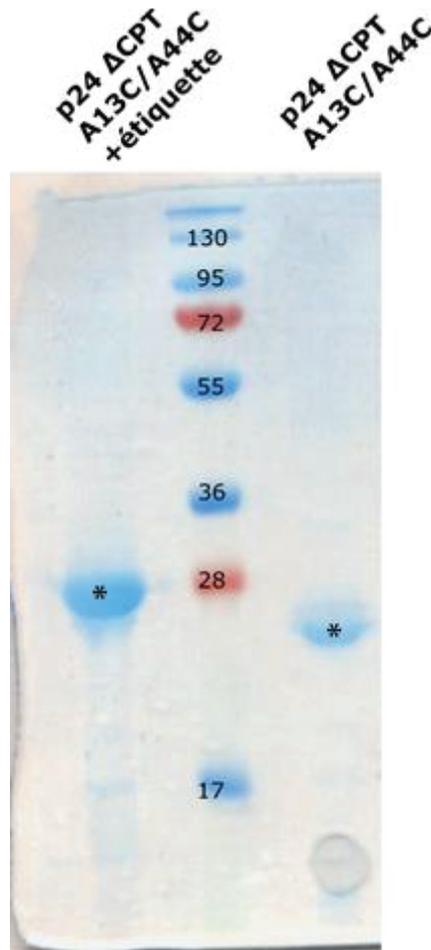


Figure 33 : Clivage protéolytique de l'étiquette et purification de la protéine sans étiquette. La protéine purifiée par chromatographie à l'étape précédente a été incubée avec le facteur Xa sur la nuit à 19°C et la protéine sans étiquette a été purifiée en collectant la fraction non retenue d'une purification à affinité pour le métal.

*c) Analyse des multimères obtenus par leur taille en solution*

Après leur production en système bactérien et purification, les deux protéines ont été utilisées pour tenter d'induire la formation des ponts disulfures. Pour la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C, j'ai utilisé un lot à 8,8 mg.mL<sup>-1</sup>. L'échantillon a été incubé à 19°C dans un tampon peu salin, NaPi 50 mM pH 7,4 NaCl 50 mM, sur une nuit pour permettre la formation des ponts disulfures, dans un tampon dépourvu d'agents réducteurs. L'échantillon a été injecté le lendemain sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille, pour détecter la présence de pics à haut poids moléculaires, qui signifieraient alors la formation d'oligomères (Figure 34).

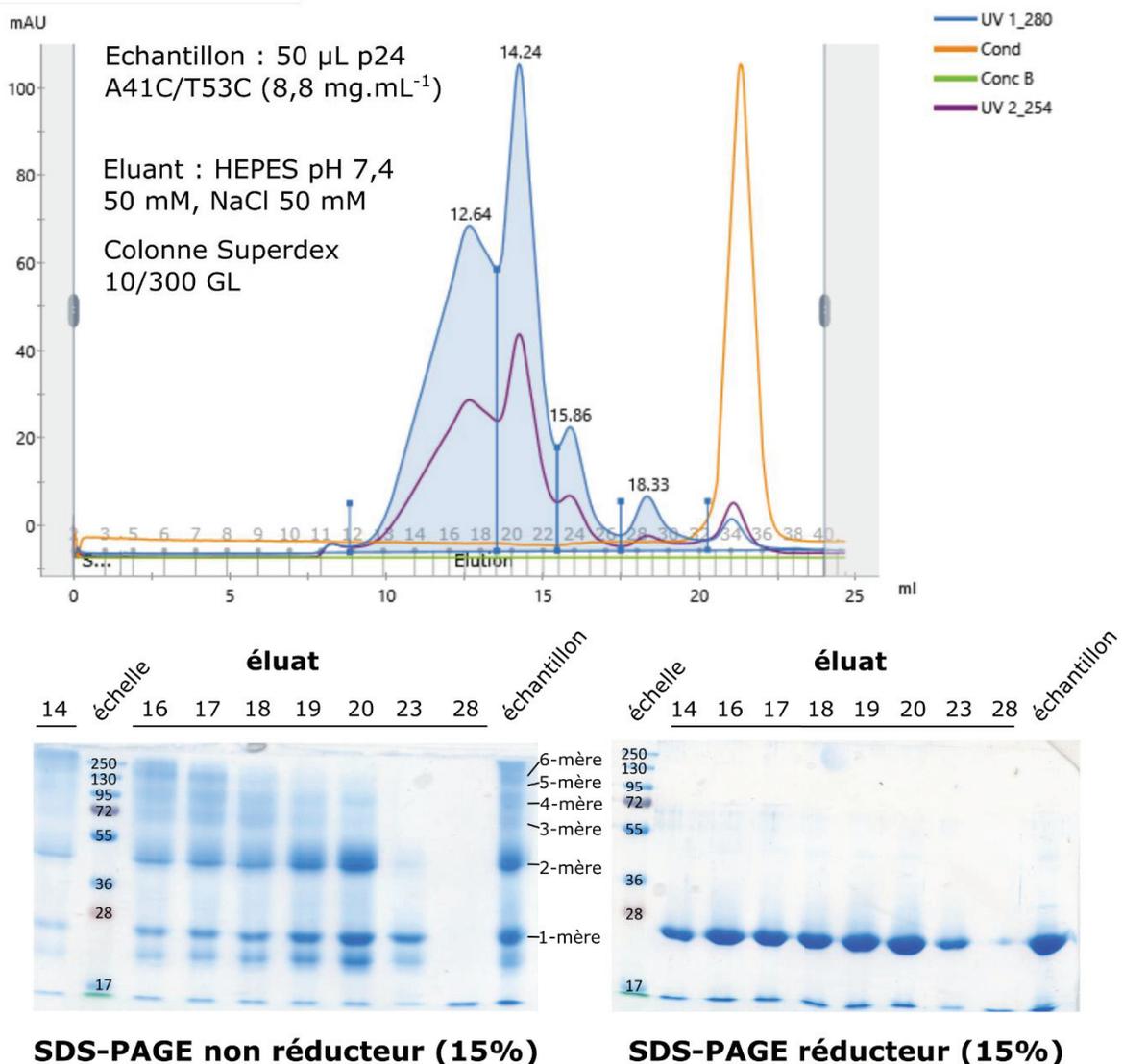


Figure 34 : Analyse de la formation d'oligomères *via* ponts disulfures. La protéine purifiée p24 A41C/T53C a été concentrée à 8,8 mg.mL<sup>-1</sup> puis injectée sur colonne d'exclusion de taille (50  $\mu$ L injecté) pour analyse. Le chromatogramme est présenté en haut. La sortie de chromatographie a été analysée sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante, réductrice (échantillons traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol 500 mM) ou non. Les numéros indiquent la fraction du chromatogramme déposée sur gel.

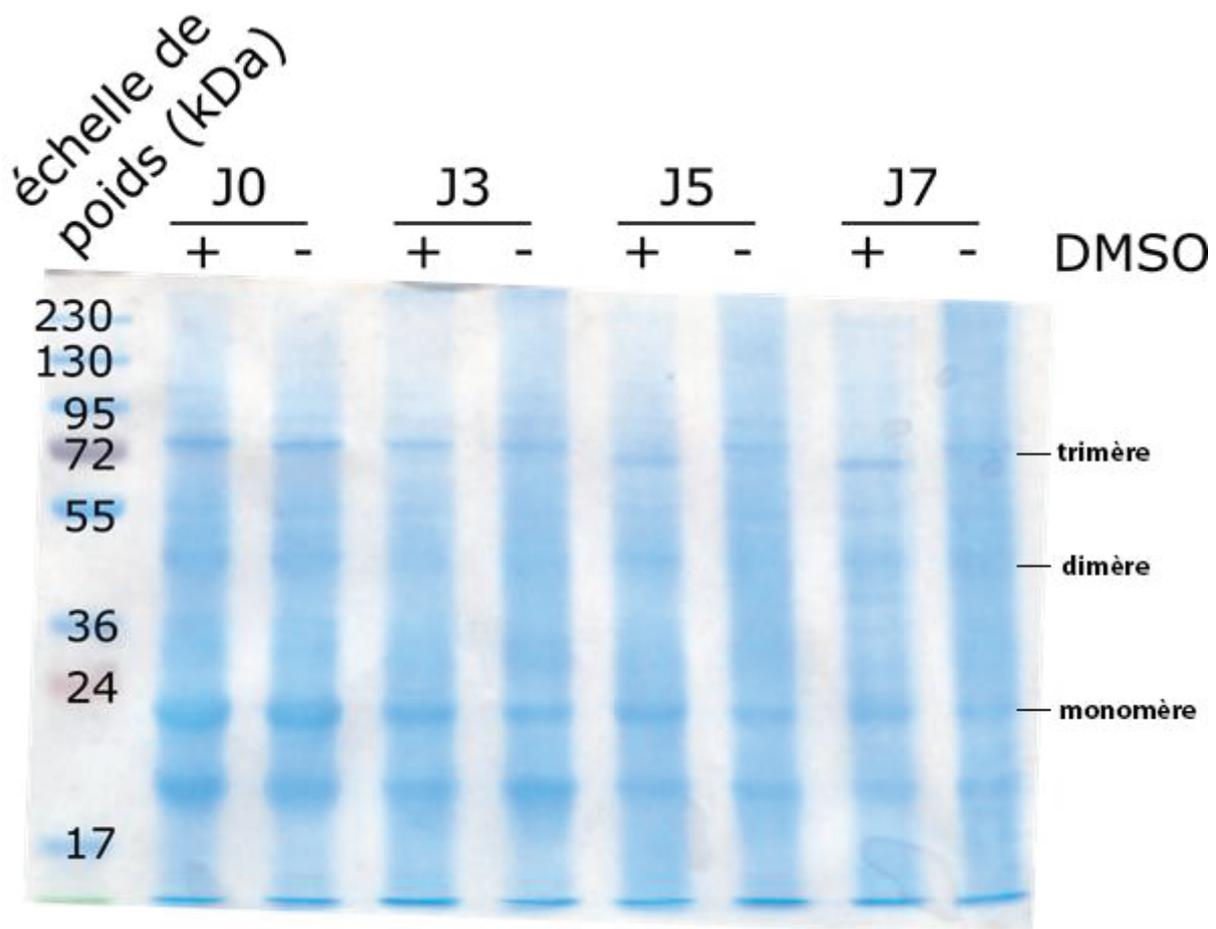
Le chromatogramme indique la présence de plusieurs particules de tailles distinctes dans l'échantillon, correspondant alors à différents degrés d'oligomérisation de l'échantillon en solution. Les pics majoritaires ressortent de la colonne à des volumes d'environ 12,6 mL, 14,2 mL, 15,9 mL et 18,3 mL (Figure 34). La comparaison avec la gamme étalon de la colonne de chromatographie indique que ces pics d'élution correspondent à des poids moléculaires apparents d'environ 210 kDa, 78 kDa, 35 kDa et 10 kDa respectivement. Le pic d'élution à 18,3 mL pourrait correspondre à un court fragment peptidique, or aucune bande n'apparaît sur le gel.

La présence de pics à différents poids moléculaires apparents indique la formation de formes multimériques, mais l'estimation des poids moléculaires ne permet pas de conclure quant à l'état d'oligomérisation de chaque espèce. De plus, il n'est pas possible à ce stade d'identifier si ces oligomères sont stabilisés par des ponts disulfures inter-chaînes ou non. Les fractions d'élution ont donc été analysées en SDS-PAGE réducteur et non réducteur (Figure 34). Sur le gel réducteur, pour chaque fraction, à l'exception de celle du pic d'élution à 18,3 mL (fraction 28), une seule bande est visible, en excluant le front de migration. Cette bande correspond à la protéine pure sous forme monomérique, sans ponts disulfures. En absence de traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol, des bandes à plus haut poids moléculaire apparaissent, correspondant donc à des oligomères de p24 reliés par des ponts disulfures et migrant alors à un poids moléculaire apparent plus grand. On observe également un dédoublement des bandes correspondant au monomère, puisqu'il existe un pont disulfure intra-chaîne entre les deux cystéines 190 et 210 qui augmente la mobilité électrophorétique par compaction de la protéine lorsqu'il est formé, par rapport aux monomères qui ne l'ont pas. Ce pont disulfure est observé dans la structure cristallographique à hauteur d'environ 50 %, ce qui est en accord avec le profil de dédoublement du pic du monomère.

La formation des oligomères par ces ponts disulfures permet l'apparition de bandes à des poids moléculaires apparents cohérents avec des multiples du poids moléculaire apparent de 24 kDa du monomère, soit 48 kDa, 72 kDa, 96 kDa, 120 kDa et 144 kDa. Ces bandes correspondent donc aux degrés supérieurs d'oligomérisation, respectivement des dimères, trimères, tétramères, pentamères et hexamères. Cependant, les pentamères et hexamères, qui sont les formes impliquées dans la formation de la capsid sous forme fullerène, apparaissent minoritaires par rapport aux monomères et dimères. Les conditions de formation des oligomères ne sont donc pas optimales pour l'obtention des hexamères attendus. De plus, les rendements de formation des hexamères ne sont pas suffisants pour permettre la cristallogenèse comme cela avait été fait pour la protéine p24 du VIH-1 (Figure 24, page 51). Le protocole de formation des ponts disulfures doit donc être optimisé.

Un test supplémentaire a été fait sur un échantillon de protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C pure à 5 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon NaP<sub>i</sub> pH 6,8 50 mM, NaCl 50 mM. Cet échantillon a été séparé en deux aliquots. L'un d'entre eux a été complété par du diméthylsulfoxyde (DMSO) 5 %, en tant qu'agent oxydant. Une petite quantité a été prélevée à différents jours (j0, j+3, j+5 et j+7) et a été immédiatement traitée au tampon de dénaturation Laemmli pour dépôt sur gel non réducteur (Figure 35).

Les profils de migration sont fortement bruités. Les bandes les plus intenses correspondent à des poids moléculaires apparents de 20, 24, 48 et 72 kDa. Les bandes à 24, 48 et 72 kDa correspondent *a priori* à des monomères, dimères et trimères de p24. La bande à 20 kDa pourrait correspondre à un monomère contenant un ou plusieurs ponts disulfures intramoléculaires qui augmenterait la mobilité électrophorétique de la protéine, comme en Figure 34.



## SDS-PAGE 10 % non-réducteur

Figure 35 : Analyse de l'ajout d'un agent oxydant (DMSO 5 %) dans un échantillon de protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) sur SDS-PAGE non réducteur. Les deux conditions comparés (avec ou sans DMSO) proviennent d'un même échantillon de protéine. Des échantillons de ces tubes prélevés le jour même, 3 jours, 5 jours ou 7 jours après ont été déposés sur gel non réducteur.

Les bandes intermédiaires, moins visibles et plus diffuses (*smear*) pourraient correspondre à plusieurs populations hétérogènes de protéines avec des nombres variables de ponts disulfures, qui empêchent une migration très nette de chaque espèce en solution et une identification précise. Aussi, plusieurs populations de protéines reliées par des ponts disulfures coexistent. Aucune différence n'est visible entre avec et sans DMSO. L'oxydation se fait sans besoin d'ajout d'un agent oxydatif. Enfin, aucune différence dans les profils de migration n'apparaît au cours du temps. Tous les ponts disulfures ont été formés le premier jour et n'évoluent plus. En conclusion, la formation des ponts disulfures ne requiert pas la présence d'un agent oxydatif et se fait dès le premier jour, au cours de la préparation de l'échantillon. De la même façon que précédemment, ce processus n'est pas adéquat pour obtenir des hexamères en quantité suffisante pour la cristallogénèse.

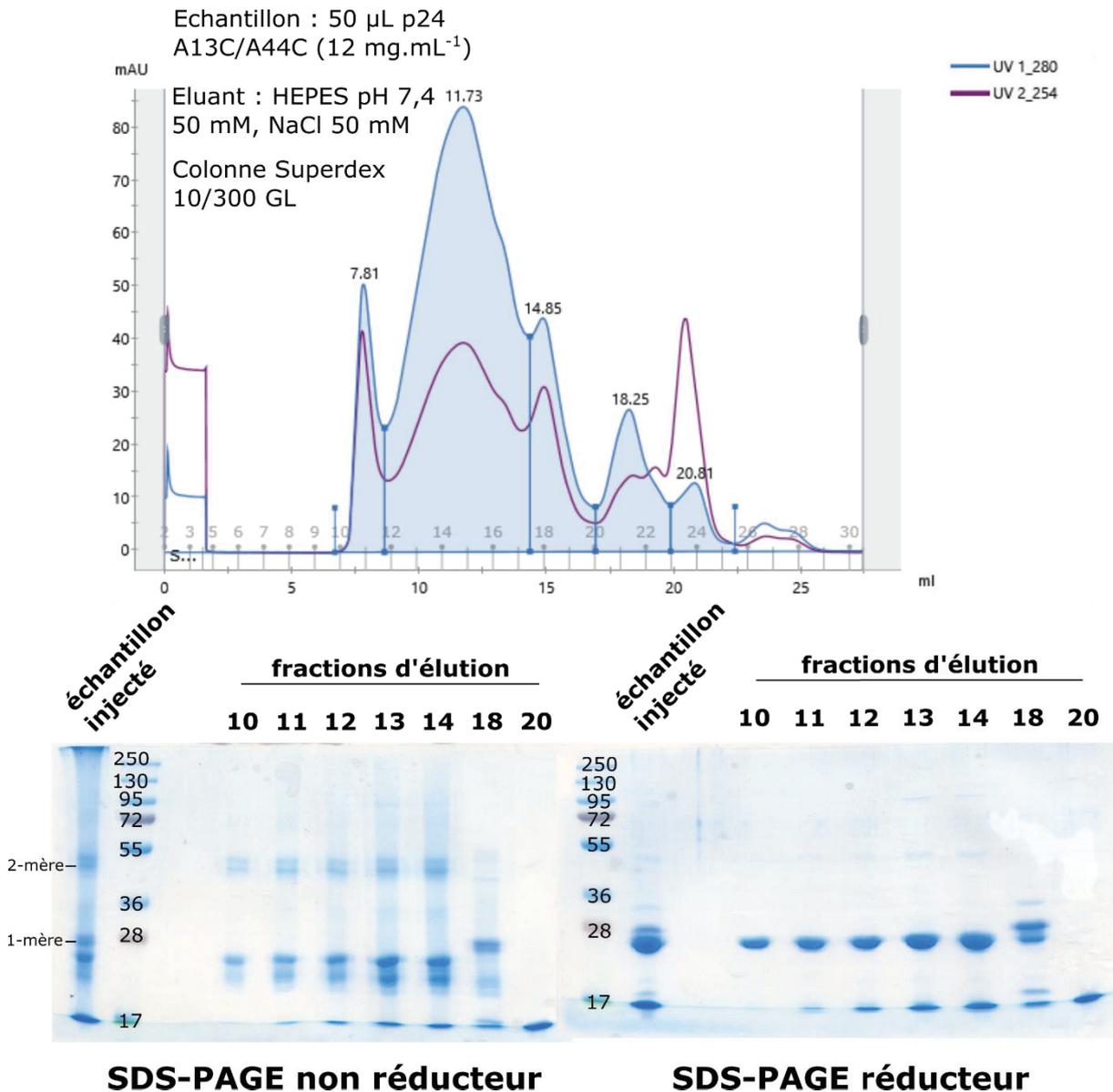


Figure 36 : Analyse de la formation d'oligomères par ponts disulfures de la protéine p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C. Panneau du haut : chromatogramme de la chromatographie d'exclusion de taille. Les volumes d'élution du maximum des pics sont indiqués sur le chromatogramme. Les numéros du panneau du bas font référence aux numéros sur le chromatogramme des fractions collectées.

Pour la protéine mutante p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C, de la même façon, un échantillon purifié a été concentré, atteignant une concentration de 12 mg.mL<sup>-1</sup>. L'échantillon a été incubé sur la nuit à 19°C et le lendemain, injecté sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille. Seules des formes monomériques et dimériques sont observées sur gel (Figure 36). Il est possible que ce mutant soit moins propice à la formation des formes pentamériques et hexamériques que le premier mutant p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C, puisque seuls des formes dimériques apparaissent.

Nous avons également utilisé ces protéines pour faire des expériences de cristallogenèse, en espérant que l'oligomérisation *via* les ponts disulfures puisse avoir lieu spontanément au sein de la goutte de cristallisation au cours du temps. Les essais de cristallogenèse ont été réalisés depuis des échantillons frais pour limiter la formation préalable de ponts disulfures. Le Tableau 4 présente les conditions testées. Quelques cristaux ont été obtenus (PEG II – B4, E12 et H5, protéine à 6,2 mg.mL<sup>-1</sup>, et MIDAS – A12, B1, G3 et G4, 8 mg.mL<sup>-1</sup>), mais ces cristaux n'ont soit pas donné de taches de diffraction de protéine, soit étaient des cristaux de sel.

Tableau 4 : Tests de cristallogenèse des protéines p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C et A41C/T53C.

			PEG I	PEG II	CS	MIDAS
p24 A41C/T53C	Bis-Tris pH 6,8	8 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM		x	x	x
	Bis-Tris pH 6,8	12 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 500 mM	x	x		
p24 A13C/A44C	HEPES pH 7,4	6,2 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 50 mM		x		

#### 4. Optimisation de la formation des ponts disulfures

Puisque la seule étape d'incubation de l'échantillon une nuit à 19°C n'est pas suffisante pour obtenir des hexamères purs en grande quantité, et que la sortie de colonne d'exclusion de taille ne permet pas d'obtenir de fraction ne contenant une seule forme hexamérique, nous avons entrepris de revoir les conditions de formation de ces ponts disulfures. Dans un premier temps, les ponts disulfures obtenus lors des expériences précédentes ont été analysés pour vérifier qu'ils ont bien été formés comme prévu entre les deux cystéines mutées de deux chaînes peptidiques différentes. Ensuite, il a été nécessaire d'optimiser les conditions de formation de ces ponts.

##### a) Analyse des dimères obtenus depuis la protéine mutante p24 $\Delta$ CPT A41C/T53C

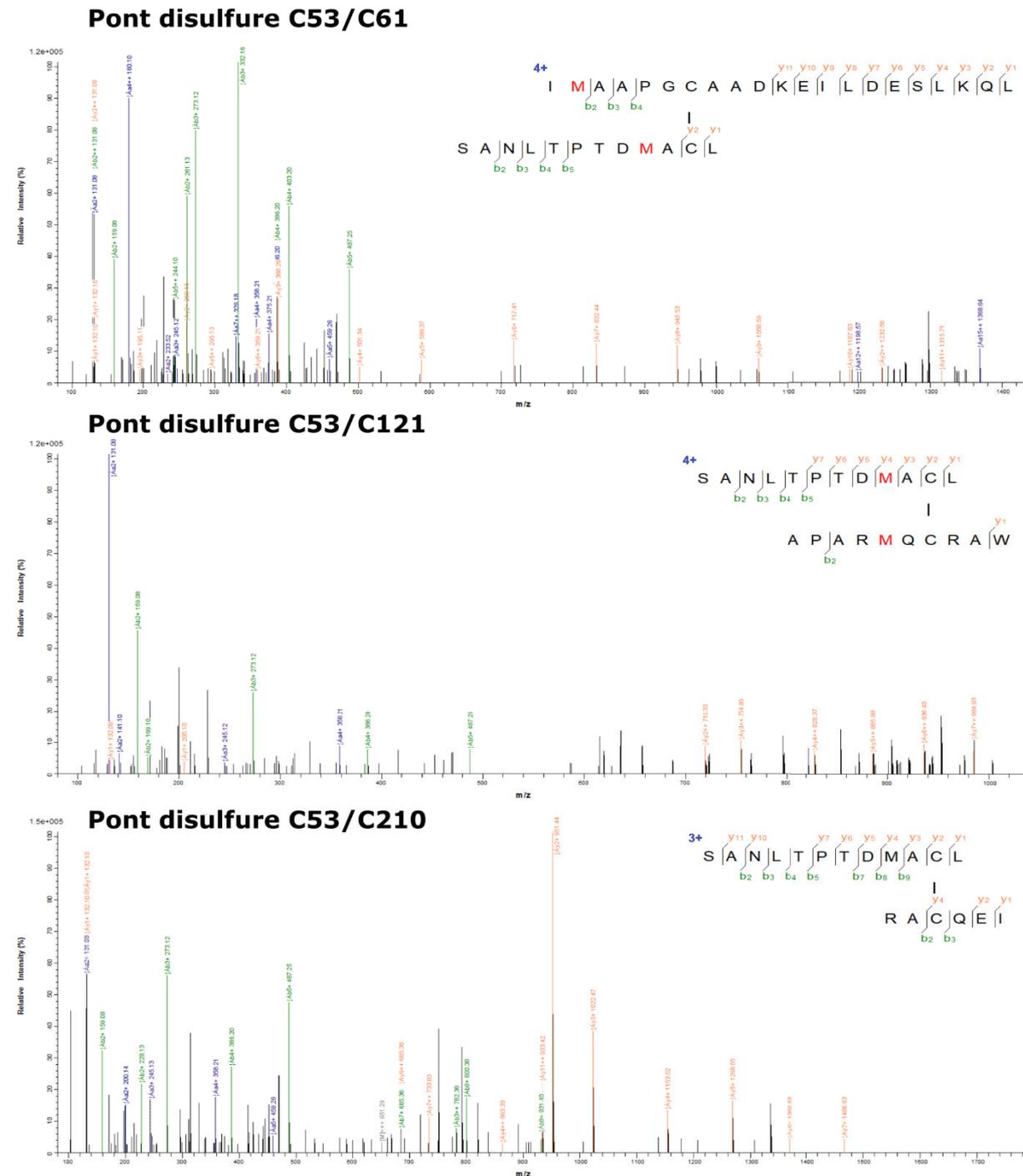
Nous avons utilisé le gel SDS-PAGE d'analyse de l'élution de chromatographie d'exclusion de taille de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C (Figure 34, page 66). Sur le gel non réducteur, la bande majoritaire est celle des dimères. La bande est bien séparée des autres et donne le signal le plus intense, facilitant son analyse par la spectrométrie de masse. Les hexamères sur le gel, plus difficiles à récupérer par leur concentration plus faible et par le manque de résolution du gel, n'ont pas été analysés par spectrométrie de masse. Nous avons donc cherché à analyser en priorité les bandes dont le poids apparent correspond à celui attendu pour des dimères, pour vérifier que les dimères formés sont ceux attendus, entre les cystéines 41 et 53 de deux chaînes peptidiques différentes.

Un gel non réducteur a été refait en utilisant du matériel extrêmement propre pour limiter les contaminations externes et permettre une analyse par spectrométrie de masse en tandem. La bande de dimère la plus intense (fraction d'élution 20, p66) a

été extraite du gel et analysée par le service de spectrométrie de masse de la plateforme « Protein Science Facility » (PSF, SFR Biosciences). Connaissant la séquence peptidique, l'analyse des masses des fragments de protéolyse par la chymotrypsine a permis d'identifier les fragments et leur composition en acides aminés. La comparaison des masses observées avec les masses théoriques inférées par la séquence de la protéine, a mis en évidence les fragments reliés par ponts disulfures cystéines impliquées dans ces liaisons. Trois ponts disulfures ont été retrouvés (Figure 37).

La cystéine 53 est impliquée dans les trois ponts identifiés, mais jamais la cystéine 41. Les trois autres cystéines sont la cystéine 61, la cystéine 121 et la cystéine 210. La cystéine 210 est généralement impliquée dans un pont disulfure avec la cystéine 190, ce qui a été observé dans la structure cristallographique de p24 FIV, mais seulement une partie des protéines dans la totalité du cristal. La cystéine 61 est celle impliquée dans le pont disulfure artéfactuel de la structure cristallographique de FIV p24 monomérique (voir Figure 25 page 54). La formation du pont C53-C61 peut donc s'expliquer par la très forte accessibilité de C61, puisqu'elle est exposée au solvant. La cystéine 121 n'était pas connue comme réactive pour la formation des ponts disulfures. L'exposition des cystéines formant des ponts disulfures est présentée sur la Figure 38. Les ponts disulfures C41/C53 et C190/C210 n'ont jamais été observés par la spectrométrie de masse.

Cela explique alors la rareté des hexamères réticulés par ponts disulfures, qui se forment par l'établissement de ponts disulfures entre des cystéines probablement de moins en moins accessibles ou de moins en moins libres. Enfin, les dimères en solution correspondent à des populations différentes faisant intervenir des couples différents de ponts disulfures, ce qui risque de diminuer la faisabilité des hexamères. Considérant que les dimères correspondent à des ponts disulfures incompatibles avec les formes hexamériques attendues, inhiber la formation des ponts disulfures artéfactuels est apparu alors comme l'étape suivante.



A41C/53C, donnant le simple mutant p24  $\Delta$ CPT C61S et les deux triples mutants p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C/C61S (notée p24  $\Delta$ CPT AAC par la suite) et p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C/C61S (notée p24  $\Delta$ CPT ATC).

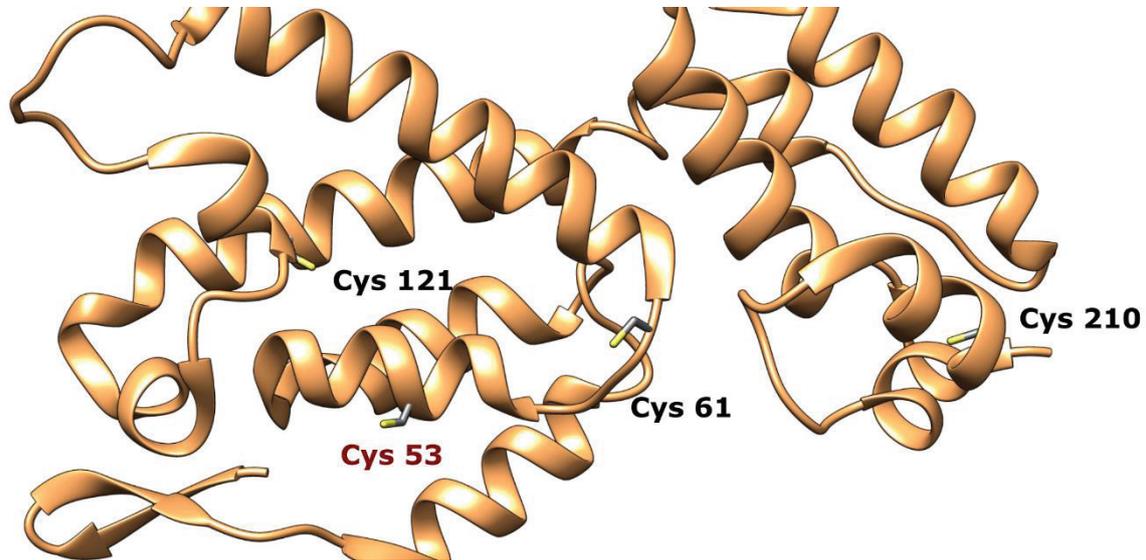
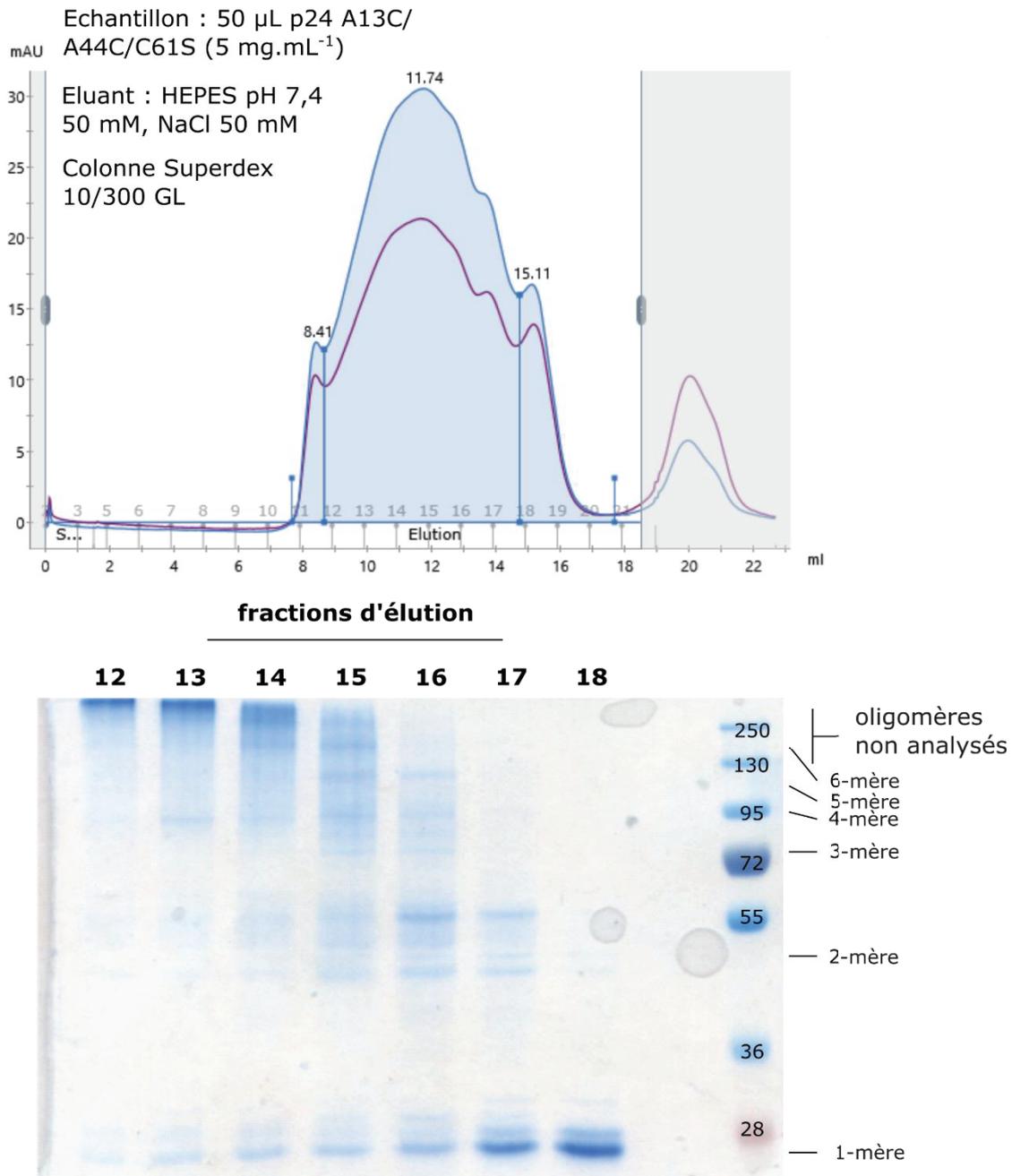


Figure 38 : Exposition des cystéines de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C formant des ponts disulfures. La structure de la protéine mutante p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C a été modélisée par simple mutation depuis la structure cristallographique. La cystéine 53 est repérée en rouge et les autres cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont également indiquées.

b) *Expression et purification des protéines p24  $\Delta$ CPT C61S, p24  $\Delta$ CPT AAC et p24  $\Delta$ CPT ATC*

J'ai exprimé les trois protéines C61S en souche T7 Express. Pour la purification, j'ai réalisé une chromatographie liquide d'affinité, suivie d'un dessalage par chromatographie d'échange d'anion pour obtenir la protéine pure, comme j'avais procédé précédemment pour les protéines p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C et p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C. Les protéines sont stockées dans un tampon HEPES pH 7,4, NaCl 50 mM après le clivage de l'étiquette de purification. Un échantillon de p24  $\Delta$ CPT AAC a été injecté sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille pour détecter la formation des ponts disulfures après incubation sur la nuit à 19°C (Figure 39). De grosses particules se sont formées et migrent à haut poids moléculaire, supérieur à 200 kDa, sur gel non dénaturant, ceci signifiant que ces agrégats impliquent des ponts disulfures. Ces bandes à poids moléculaires élevés représentent une part importante de l'échantillon mais ne correspondent pas à des hexamères puisque leur poids est bien supérieur. Des oligomères à degré inférieur d'oligomérisation, y compris ceux cohérents avec des pentamères et des hexamères, sont visibles mais minoritaires. Les conditions ne sont donc toujours pas optimales pour la formation des hexamères.

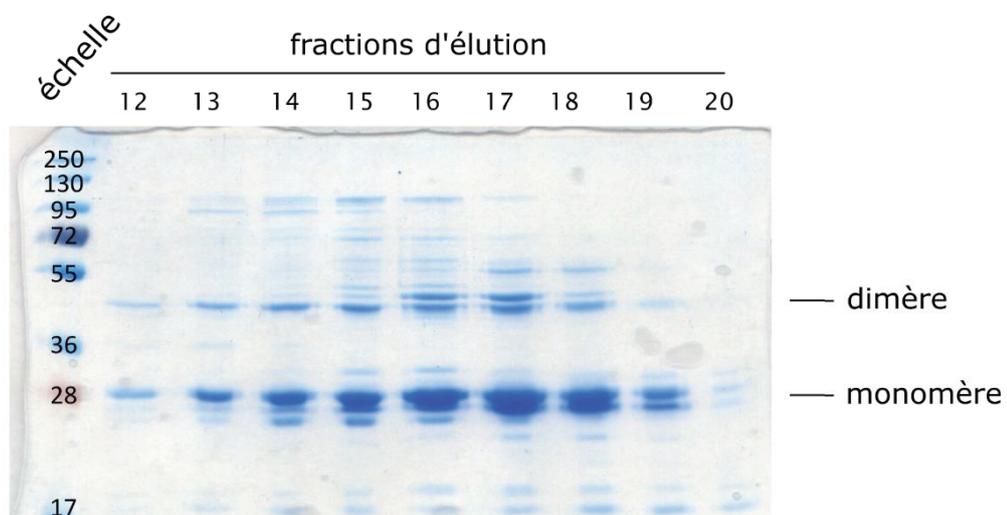
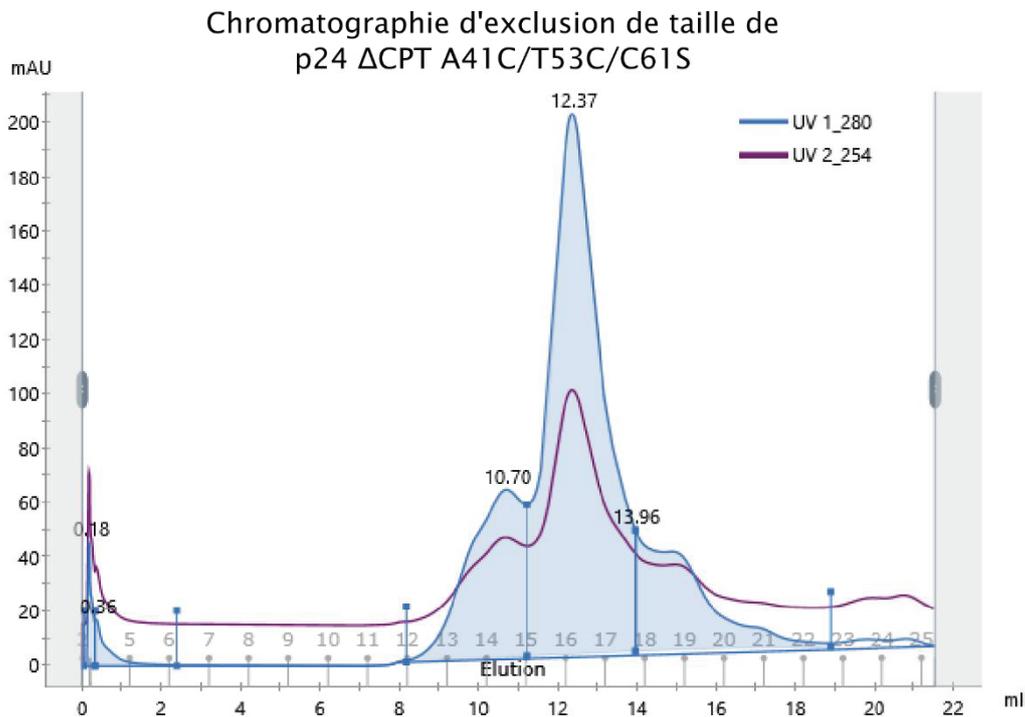


### SDS-PAGE non réducteur

Figure 39 : Analyse de la formation d'oligomères de p24  $\Delta$ CPT AAC par chromatographie d'exclusion de taille et dépôt sur gel non réducteur. La résolution de la résine de la colonne permet de séparer les protéines de 600 kDa à 10 kDa, avec un volume mort de colonne d'environ 8 mL. Les protéines éluées à ce volume n'ont pas été séparées et restent donc non analysées. Le gel SDS-PAGE (12 %) ne permet pas de séparer suffisamment les protéines de plus de 250 kDa pour voir leur taille. Les bandes théoriques des multimères sont indiquées sur le gel.

Pour la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC, de la même façon un échantillon concentré à 5 mg.mL<sup>-1</sup> a été analysé par chromatographie d'exclusion de taille après incubation à 19°C sur la nuit et l'élution a été déposée sur gel non réducteur (Figure 40). Les

bandes majoritaires sont celles correspondant à des dimères et monomères et très peu d'assemblage à poids moléculaire supérieur sont visibles.



### SDS-PAGE non réducteur

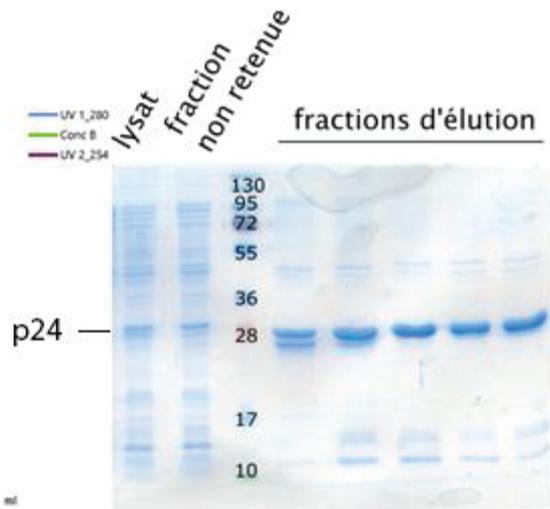
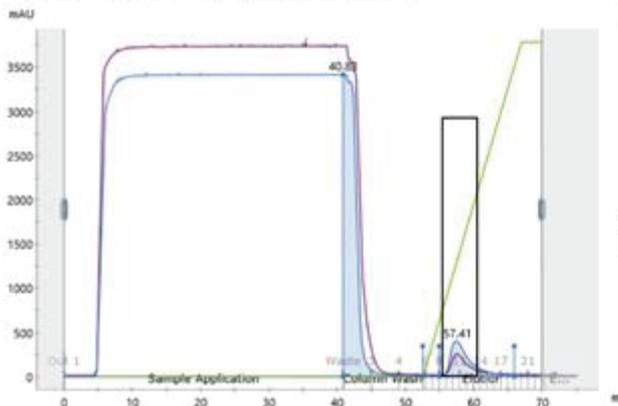
Figure 40 : Analyse de la formation des formes oligomériques sur gel non réducteur des fractions d'élution de chromatographie d'exclusion de taille de la protéine p24 ATC. Les poids moléculaires attendus pour les monomères et dimères sont indiqués comme repère. Les numéros de dépôt correspondent aux fractions d'élution.

Enfin, j'ai réalisé une purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT C61S selon le même protocole (Figure 41). Cette protéine ne permet pas de former des ponts disulfures de réticulation des hexamères et n'a donc pas été analysée sur colonne de filtration

sur gel mais utilisée directement pour la cristallogénèse, en espérant former les hexamères tout en prévenant le dimère artificiel.

#### Chromatographie d'affinité

Colonne : TALON HP 1 mL  
 Tampon : NaPi pH 7,4  
 50 mM, NaCl 300 mM



#### Chromatographie échangeuse d'anion

Colonne : Q HP 1 mL  
 Tampon : NaPi pH 7,4  
 50 mM, NaCl 50 mM  
 Eluant : NaCl 1 M

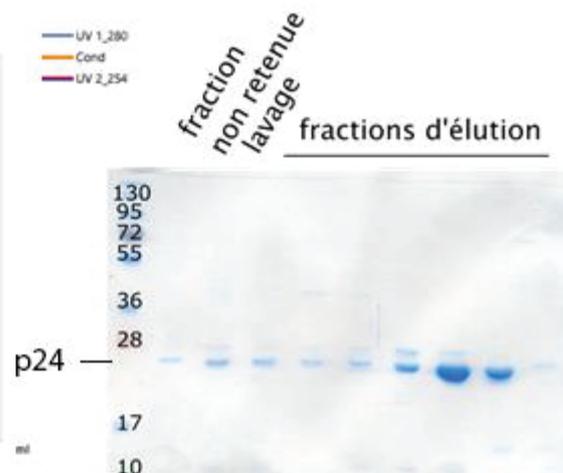
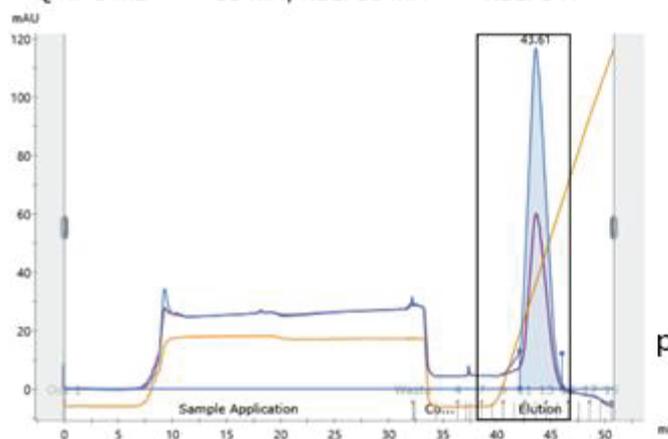


Figure 41 : Purification de la protéine p24  $\Delta$ CPT C61S. Le panneau du haut décrit la chromatographie d'affinité et le panneau du bas la chromatographie d'échange d'anion. Les encadrés indiquent les fractions d'élution déposées sur gel.

Puisque la protéine p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C et son mutant C61S montrent une forte capacité à former de gros agrégats ou majoritairement des dimères, pour la suite de ce travail, je me suis principalement concentré sur l'expression et la purification de p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C et p24  $\Delta$ CPT ATC. Les lots des protéines produits ont été utilisés en cristallogénèse après clivage protéolytique de l'étiquette (Tableau 5) et par la suite, j'ai principalement travaillé sur la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC. Des échantillons de p24  $\Delta$ CPT ATC ont également été préparés dans d'autres tampons de stockage, comme le Bis-Tris pH 6 ou pH 6,8. Aucune condition n'a donné de cristal.

Tableau 5 : Tests de cristallogenèse des protéines p24  $\Delta$ CPT C61S, p24  $\Delta$ CPT AAC et p24  $\Delta$ CPT ATC avec des kits de cristallogenèses commerciaux.

			PEG I	PEG II	CS	MIDAS	MB Class II	Natrix	JCSG+	AmSO4	BCS
p24 A41C/ T53C/ C61S	Bis-Tris pH 6	7 mg.mL <sup>-1</sup>		X		X					
p24 A13C/ A44C/ C61S	Bis-Tris pH 6,8	50 mg.mL <sup>-1</sup>		X							
p24 C61S	Bis-Tris pH 6,8	23 mg.mL <sup>-1</sup>	X	X							
		29 mg.mL <sup>-1</sup>	X	X	X			X	X		X
		19 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 500 mM			X		X			X	
	Tris pH 8	17 mg.mL <sup>-1</sup>	X	X	X						

c) *Vérification du bon repliement du mutant ATC*

Pour s'assurer qu'aucune mutation n'a perturbé la stabilité de la protéine, j'ai réalisé des expériences de dichroïsme circulaire pour vérifier la formation des structures secondaires sur un échantillon en solution. Ainsi, la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC concentrée à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> dans un tampon NaPi 10 mM, NaCl 10 mM a été analysé dans le spectrophotomètre (Figure 42).

Le spectre de la protéine, bien que bruité, présente deux pics négatifs vers 210 et 225 nm, caractéristique d'une protéine riche en hélices  $\alpha$ . L'expérience de dichroïsme circulaire montre que la protéine conserve son repliement en hélices  $\alpha$  malgré les mutations.

Le signal dichroïque a été déconvolué *via* le logiciel en ligne DichroWeb (Whitmore et Wallace, 2008). Les résultats de déconvolution sont présentés dans le Tableau 6. Ces derniers sont similaires à ceux publiés préalablement pour la protéine p24  $\Delta$ CPT (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013) compatibles avec la structure de p24 connue, majoritairement en hélice  $\alpha$ .

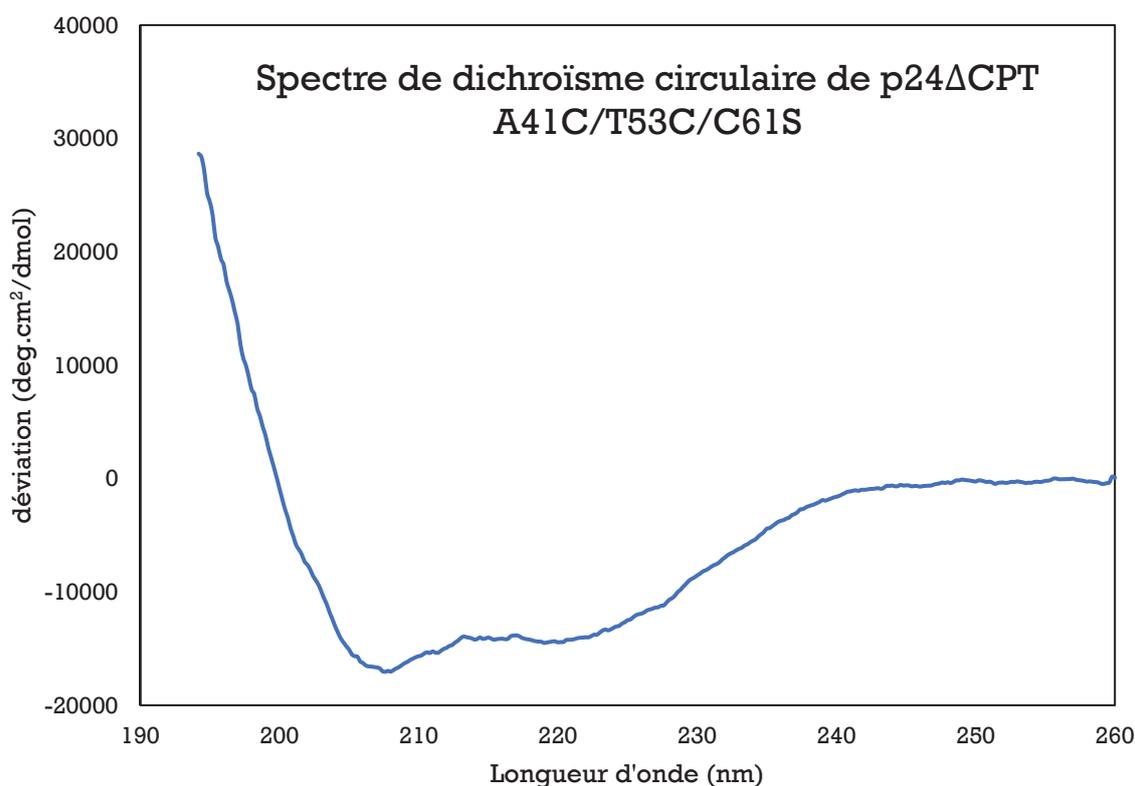


Figure 42 : Spectre de la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC en solution. Le signal de la protéine montrait une saturation en deçà de 192 nm et a été tronqué en conséquence.

Tableau 6 : Déconvolution du spectre de dichroïsme circulaire de la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC par le logiciel DichroWeb (Whitmore et Wallace, 2008).

Type de structure	Hélice	Brin	Tour	Région désordonnée
<b>Pourcentage</b>	58 %	3 %	20 %	19 %

*d) Incubation en dialyses successives en conditions réductrices puis oxydantes*

Une stratégie adoptée par les auteurs de l'article sur la cristallogénèse des hexamères de protéine p24 de VIH-1 a été de produire et purifier les protéines VIH-1 p24 A14C/E45C et VIH-1 p24 A42C/T54C, de les concentrer à 1 mg.mL<sup>-1</sup> et de mettre les échantillons en dialyse, contre successivement trois tampons différents (Pornillos *et al.*, 2010). Le premier a une haute salinité (NaCl 1 M) et contient un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol 200 mM) ; l'agent réducteur réduit les ponts disulfures artéfactuels formés au cours du processus de purification et la salinité stimule l'assemblage hexamérique des protéines. Le deuxième tampon conserve la forte salinité pour maintenir l'assemblage hexamérique mais sans agents réducteurs pour permettre la reformation des ponts disulfures voulus entre les mutations cystéines maintenant à proximité. Enfin, la dernière dialyse permet de changer le tampon contre un tampon peu salin, adapté à la cristallogénèse.

J'ai reproduit cette stratégie contre les échantillons de p24 FIV, en faisant une première dialyse de p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C/C61S contre un tampon NaCl 1 M,  $\beta$ -mercaptoéthanol 200 mM, une deuxième dialyse contre un tampon NaCl 1 M sans agent réducteur puis un troisième tampon de différentes compositions pour cribler les conditions expérimentales, avec différents pH, de pH 6 à pH 8 et en concentrant ou non les échantillons pour couvrir différentes gammes de concentrations protéiques de 1 à 30 mg.mL<sup>-1</sup>. Les échantillons ainsi préparés ont été testés en cristallogénèse dans différents kits (Tableau 7).

Tableau 7 : Test de cristallogénèse de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C/C61S avec des kits commerciaux. La protéine a été préparée par le protocole de dialyse successive décrit préalablement.

		PEG I	PEG II	CS	MbClass II
HEPES pH 6.8	6 mg.mL <sup>-1</sup>		x		x
Tris-base pH 8	30 mg.mL <sup>-1</sup> NaCl 300 mM	x	x	x	
Tris-base pH 8	1 mg.mL <sup>-1</sup>	x	x	x	x

Aucun n'a donné de résultats de cristallogénèse. Ainsi, malgré les différentes stratégies que j'ai développées pendant ma thèse, la structure de l'hexamère de p24 FIV reste à élucider, ce qui serait utile pour l'identification et la mise au point de composés thérapeutiques ciblant l'assemblage.

## B. Identification de ligands et caractérisation par la RMN

### 1. Attribution RMN de la protéine de capsid

L'autre approche de ma thèse repose sur un criblage pour identifier des molécules interagissant avec la capsid puis élucider les mécanismes de fixation sur la protéine. L'identification de ces mécanismes de fixation permettrait de guider la mise au point des molécules les plus affines possibles et ainsi, développer des molécules interagissant fortement avec la capsid et potentiellement inhibitrices de la réplication du FIV.

Pour réaliser cette approche, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) représente une solution adéquate pour identifier les sites d'interaction protéine:ligand d'intérêt, car elle peut fournir des informations pour la caractérisation de la surface d'interaction de la molécule sur la protéine. Nous avons donc choisi d'utiliser la RMN en solution pour caractériser les interactions entre p24 et des ligands potentiels d'intérêt. La protéine FIV p24 n'étant pas

attribuée en RMN, la première étape était de réaliser l'attribution séquentielle des acides aminés. Celle-ci requiert l'acquisition du signal de la chaîne peptidique et pour cela, l'acquisition d'un jeu complet de données sur une protéine marquée au  $^{13}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$  et l'acquisition des résonances des différents éléments de la chaîne peptidique. Nous avons donc travaillé sur l'attribution de la protéine tronquée p24  $\Delta\text{CPT}$  dont l'étiquette de purification a été retirée par clivage protéolytique, pour pouvoir comparer l'attribution avec la structure que nous avons résolue par cristallographie. Ceci permettra aussi de se servir de cette structure cristallographique pour comprendre les résultats d'interaction protéine:ligand obtenus avec la RMN. J'ai produit les échantillons et les ai envoyés aux scientifiques du TGIR (Très Grande Infrastructure de Recherche) de RMN à l'université de Lille (Dr. X. Hanouille, *Integrative Structural Biology*, Université de Lille). L'ensemble des spectres ont été acquis sur un spectromètre Bruker à 900 MHz, équipé d'une cryosonde pour la détection. Nous avons récupéré les spectres et j'ai pu ensuite, après formation à l'université de Lille, les traiter.

#### a) *Analyse initiale de la faisabilité de l'attribution*

Les expériences préliminaires de marquage au  $^{15}\text{N}$  permettent d'acquérir un spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Cette expérience RMN donne le signal des couples N-H de la molécule, et donc notamment du squelette peptidique, en plus des autres couples N-H portés par les radicaux des acides aminés. L'expérience permet ainsi de détecter tous les acides aminés du squelette peptidique de la protéine, à l'exception des prolines qui ne portent pas de  $^1\text{H}$  amide. Cette expérience HSQC donne une cartographie du signal de la protéine, permettant de s'assurer que les conditions expérimentales sont adéquates avant de réaliser un marquage complet (Figure 43).

La protéine était dans un tampon  $\text{NaP}_i$  pH 6,8 50 mM,  $\text{NaCl}$  50 mM, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$  à  $25^\circ\text{C}$  et à concentration de  $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , inférieure à la concentration critique d'oligomérisation déterminée au préalable à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013). Le signal était d'une bonne qualité et le nombre de pics observés correspondait au nombre attendu, suggérant que les conditions expérimentales et d'acquisition du signal étaient optimales, notamment pour les expériences RMN suivantes. (Figure 43). On remarque également que l'échantillon semble se dégrader au cours du temps, partiellement, et l'apparition des pics au bout de 14 jours laisse penser que la protéine perd son repliement. Les spectres ont été acquis à température ambiante ( $25^\circ\text{C}$ ).

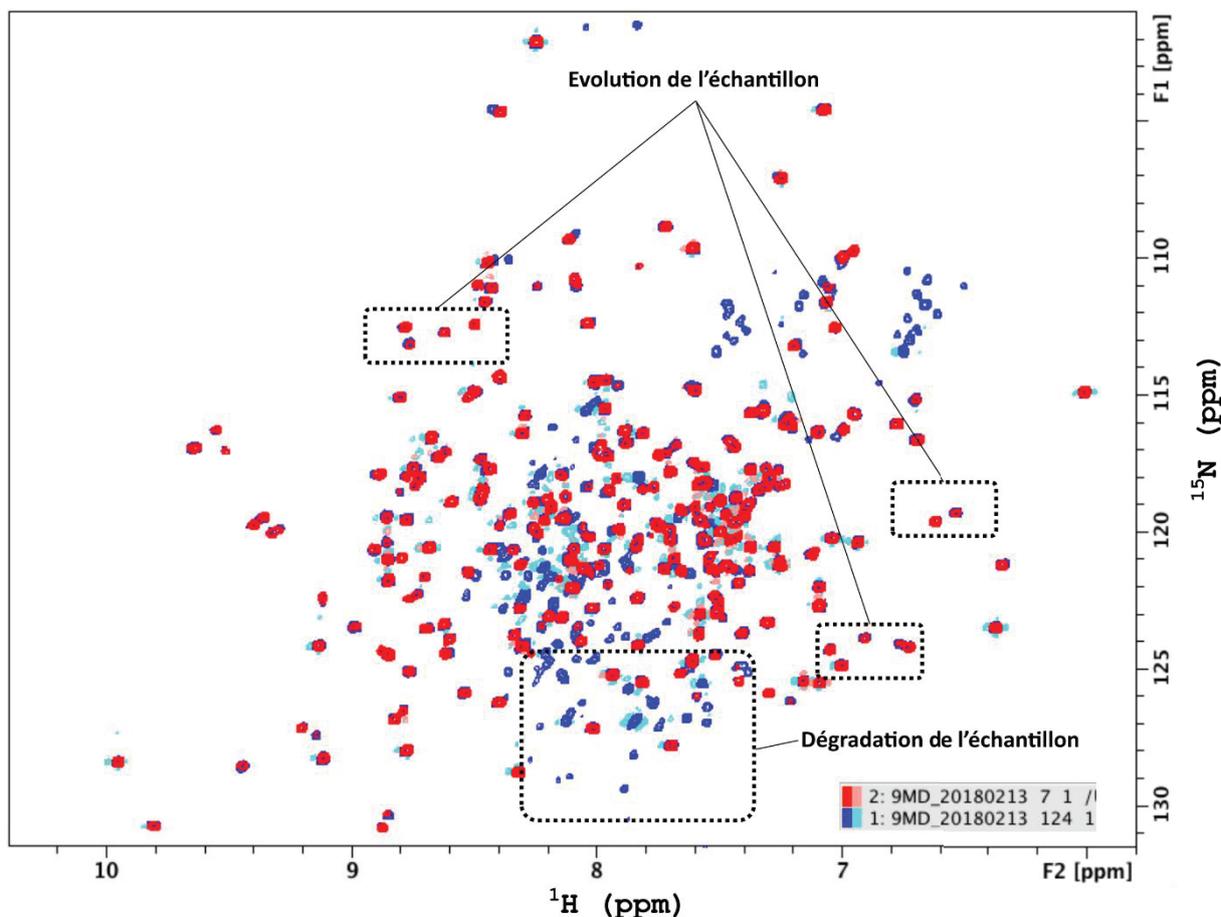


Figure 43 : Évolution du signal  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine  $^{15}\text{N}$  - FIV p24 entre  $j_0$  (en rouge) et  $j_{14}$  (bleu) à  $25^\circ\text{C}$  dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Les cadres soulignent quelques zones de différences notables (décalage des déplacements chimiques ou variation de l'intensité des pics – « évolution de l'échantillon ») ou l'apparition de pics, suggérant une dégradation de la protéine et l'apparition des signaux des acides aminés libres.

### b) Acquisition des signaux en RMN 3D de la protéine

Pour l'attribution des pics des expériences HSQC, il est nécessaire de marquer également les carbones au  $^{13}\text{C}$  pour réaliser des expériences d'acquisition informatives pour l'attribution séquentielle, faisant apparaître des corrélations de résonance entre les carbones, azotes et hydrogènes de la chaîne peptidique. Dans un premier temps, nous avons produit des échantillons marqués à ces deux éléments uniquement. La protéine  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  - p24 a été produite à une concentration finale de  $2,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , dans le même tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$  pour accroître l'intensité du signal pour les besoins des acquisitions 3D ; un aliquot de cette solution a été prélevé pour vérifier que la dimérisation n'avait pas lieu. À différents temps, le jour-même ( $j_0$ ), après un jour à  $19^\circ\text{C}$  ( $j_1$ ) ou deux ( $j_2$ ), une fraction a été traitée à un agent de pontage covalent, le bis(sulfosuccinimidyl)subérate ( $\text{BS}^3$ ). L'agent de pontage possède deux fonctions chimiques pouvant se lier aux groupements amines libres des lysines de la protéine. Les deux groupements sont séparés par un bras espaceur à 8 atomes de carbone et peuvent ainsi relier deux lysines suffisamment proches. Si deux

protéines sont suffisamment proches, le pontage covalent peut alors s'effectuer entre les lysines et on observe alors sur gel l'apparition de bandes à plus haut poids moléculaire. Aucune bande n'est apparue dans nos tests (Figure 44). La protéine semble donc rester sous forme monomérique.

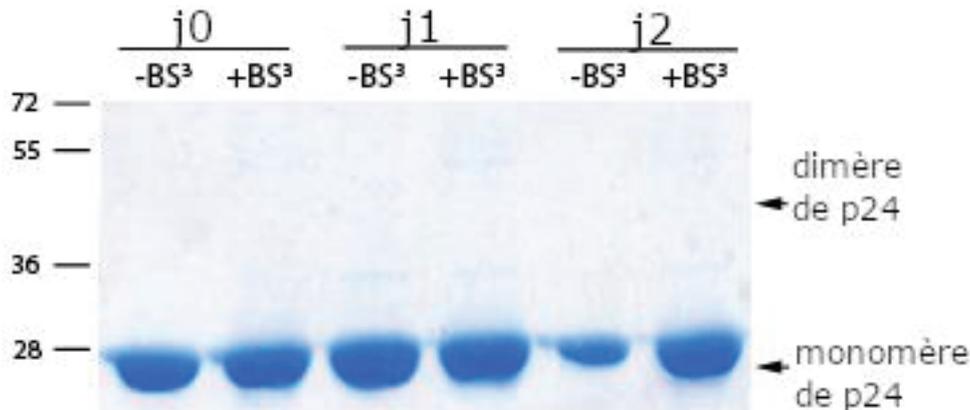


Figure 44 : Test de dimérisation au  $BS^3$ . Un aliquot de la protéine marquée pour la RMN, à la concentration de  $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a été prélevé pour un test de multimérisation au  $BS^3$  au cours du temps, le jour-même (j0), après un jour à température ambiante ( $20^\circ\text{C}$ , j1) ou deux jours (j2). Aucune bande n'est apparue à la taille attendue pour un dimère, ni à des poids supérieurs.

De façon inattendue, les spectres HSQC acquis sur un même échantillon que précédemment de protéine p24 marquée, à différents jours présentent des différences, qui laissent penser à un réajustement structural de la protéine (Figure 45). Il est ainsi possible que malgré une absence de dimérisation, la protéine s'assemble à une affinité basse, perturbant le signal. Ces variations de déplacements chimiques peuvent également témoigner d'un changement conformationnel s'effectuant après la décongélation entre le jour-même et le lendemain (Figure 45).

Les variations de quelques ppm de déplacements chimiques entre ces dédoublements sont caractéristiques d'un réarrangement structural léger des acides aminés correspondant. Ainsi, au jour 1, deux populations de protéines coexistent, l'une correspondant à la forme du jour 0 et l'autre à une forme avec réarrangement. Cette différence peut simplement provenir d'un changement de structure entre la forme décongelée extemporanément et la forme stable à température ambiante. Une acquisition supplémentaire au jour 0, jour 1 et jour 7 montre de nouveaux déplacements entre le jour 1 et le jour 7 avec des déplacements de pics, voire des disparitions (Figure 46). Les dédoublements de la Figure 45 ne sont plus observés au jour 7 et les pics restants correspondent à la nouvelle forme après réarrangement structural.

En revanche, on observe de nouvelles perturbations sur certains pics et une disparition pour certains. Plusieurs explications sont possibles, comme une dégradation de la protéine, ou un réarrangement structural qui continuerait au

cours du temps, sur d'autres régions encore non perturbées entre le jour 0 et le jour 1.

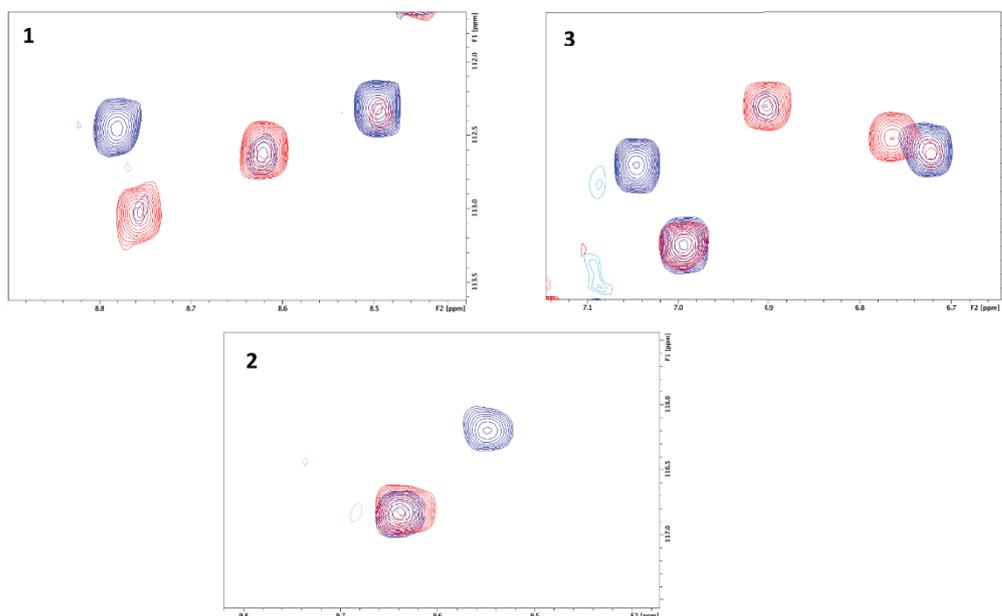
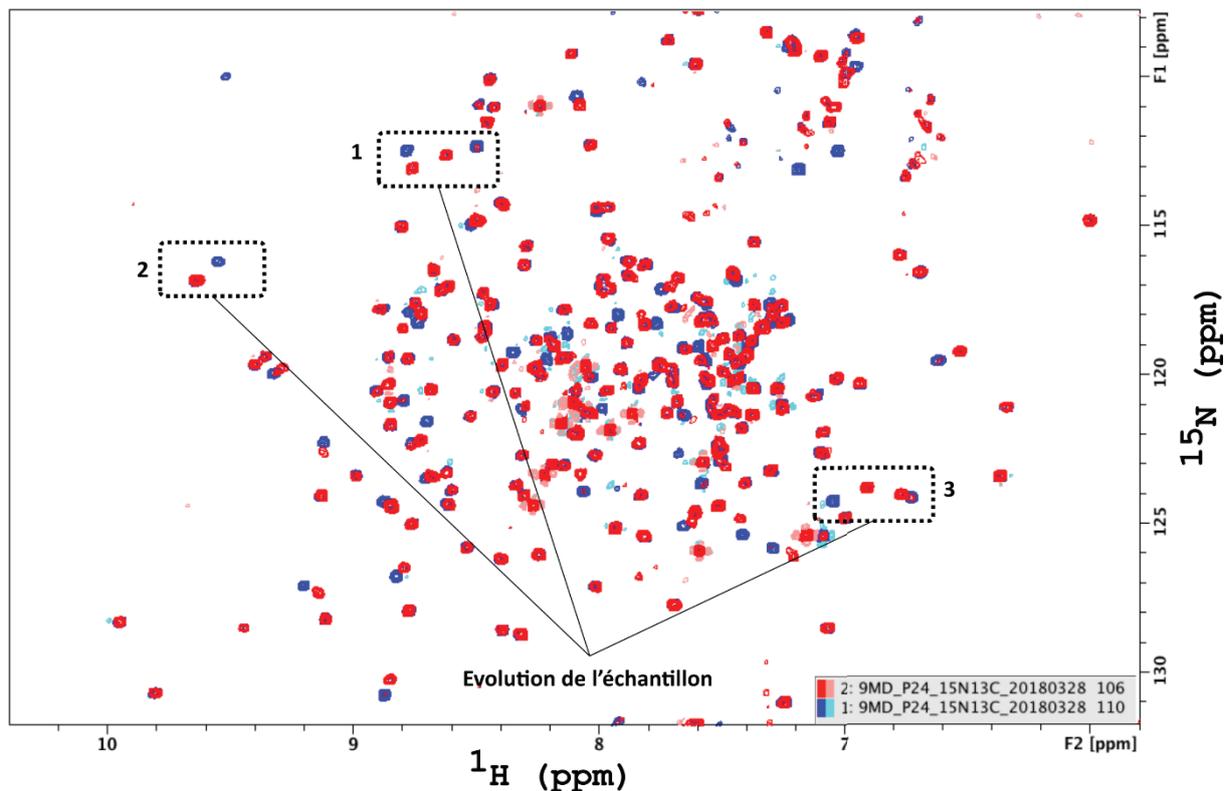


Figure 45 : Évolution des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  - p24, à 25°C dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ . La figure présente les deux spectres à j0 (en bleu) et le lendemain (en rouge). Certains pics présentent des décalages de déplacements chimiques, dont certains sont mis en valeur dans les encadrés.

La dégradation de la protéine est peu probable en revanche, puisque la majeure partie des pics n'est pas ou que peu modifiée entre l'acquisition au jour 1 et au jour

7. La dernière hypothèse est qu'en absence d'agents réducteurs aux concentrations suffisantes, les cystéines libres de la protéine et en particulier la cystéine 61 très réactive (voir la partie II.A.4 page 70) formeraient des oligomères augmentant le poids moléculaire de la molécule globale et donc, diminueraient l'intensité du signal *via* la relaxation du système. Ces multimérisations n'ont pas été observées sur le gel de la figure 18 effectué en conditions non réductrices.

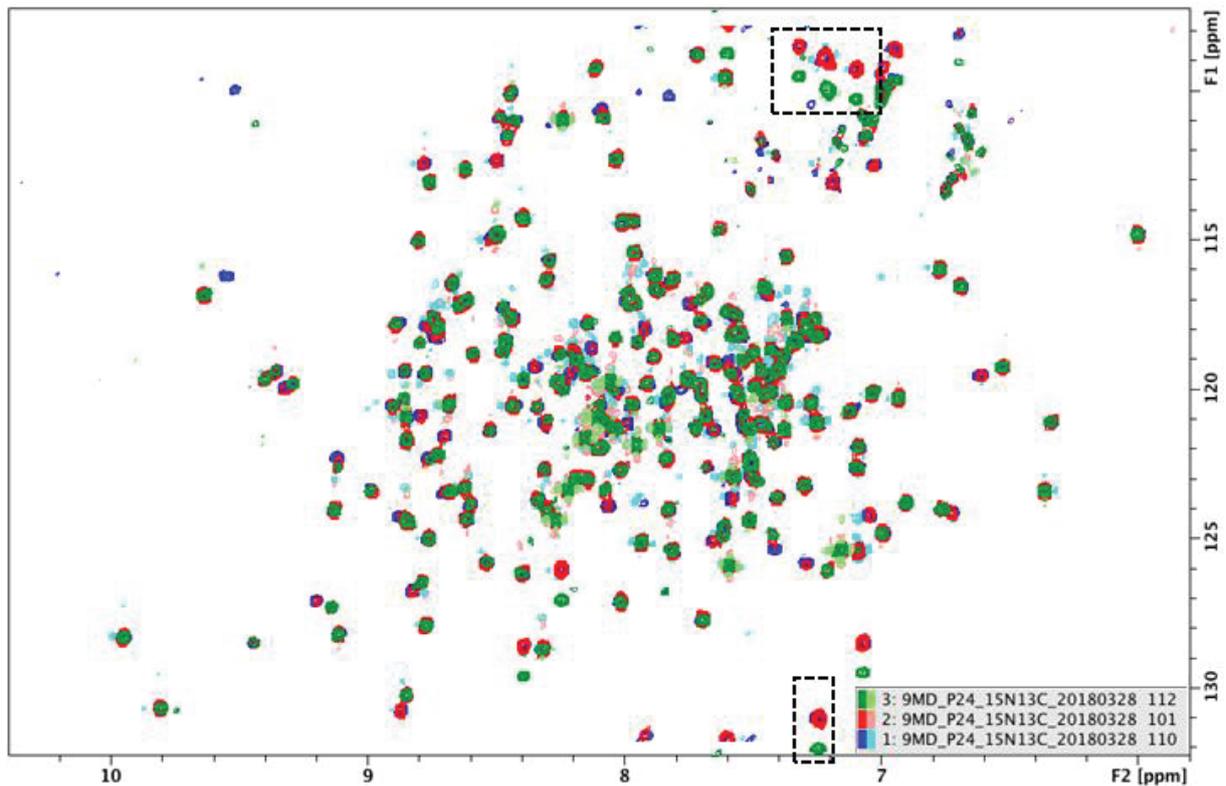


Figure 46 : Évolution de l'échantillon entre le jour de décongélation (bleu), le lendemain (rouge) et une semaine après (vert). Dimension F1 :  $^{15}\text{N}$  (ppm), dimension F2 :  $^1\text{H}$  (ppm). Les encarts repèrent les variations de pics entre le jour 1 et le jour 7.

Du fait de la faible différence entre les spectres à j1 et j7, les expériences suivantes ont donc été menées sur des protéines décongelées la veille. Le signal  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  est cependant de très bonne qualité avec les pics très visibles.

Cependant, les spectres 3D acquis sur ce lot de protéine étaient d'une qualité hétérogène (Figure 47). L'expérience HNCOC est la plus sensible et le spectre associé comprend un grand nombre de pics. En revanche, les autres spectres, nécessaires à l'attribution, ont un signal trop faible pour que le jeu de spectres soit exploitable, avec une dizaine de pics sur l'expérience HNCACB qui est celle qui doit en générer le plus, puisqu'elle indique de nombreuses corrélations de résonance  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  (Figure 47). Ces spectres ne sont pas exploitables pour l'attribution. Cette mauvaise qualité des spectres 3D fait écho à la dynamique de la protéine, observée sur les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (Figure 45), qui expliquerait cette chute du rapport signal/bruit.

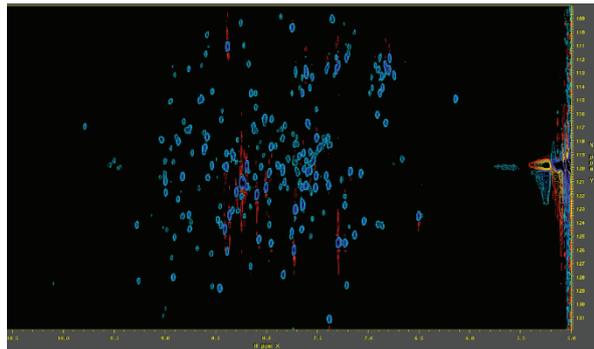
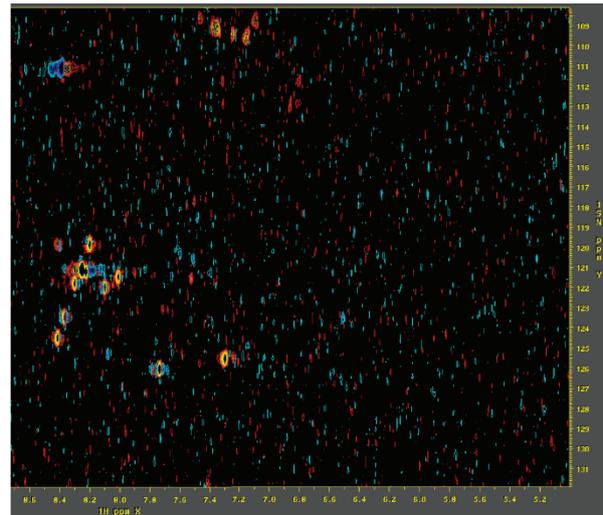
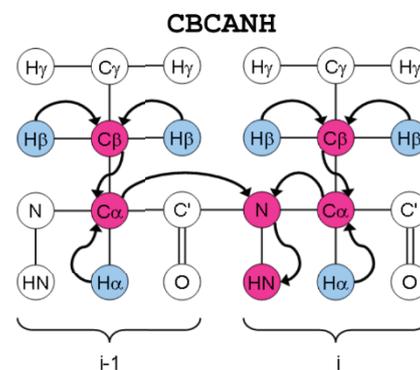
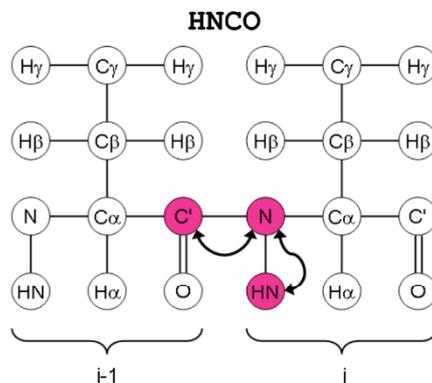
plan  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HNCOCY -  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  p24plan  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  CBCANH -  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  p24

Figure 47 : Spectres RMN 3D HNCOCY et CBCANH de la protéine  $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}$  p24 à  $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$  dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM. Les pics attendus sur les spectres sont décrits dans les schémas du bas.

c) *Triple marquage de l'échantillon au deutérium,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$*

Le double marquage seul n'a pas permis d'acquérir la totalité des spectres avec un rapport signal/bruit suffisant. La principale hypothèse est que la relaxation du signal de la protéine est trop importante pour pouvoir acquérir tous les spectres. En conséquence, nous avons produit des échantillons triplement marqués au deutérium (D), au  $^{13}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$ . Les rendements d'expression sont moindres que précédemment (Figure 48), ce qui peut être expliqué par la toxicité du deutérium en haute quantité (Abilev *et al.*, 2018).

Cette production n'a donc permis la production que d'un seul échantillon à une concentration finale de  $2,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{M}$ ), dans le même tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Ce seul échantillon n'a pas permis d'acquérir tous les spectres nécessaires à l'attribution, du fait de la modification de l'échantillon au cours du temps, alors que l'échantillon doit rester stable dans le spectromètre durant la totalité de l'acquisition.

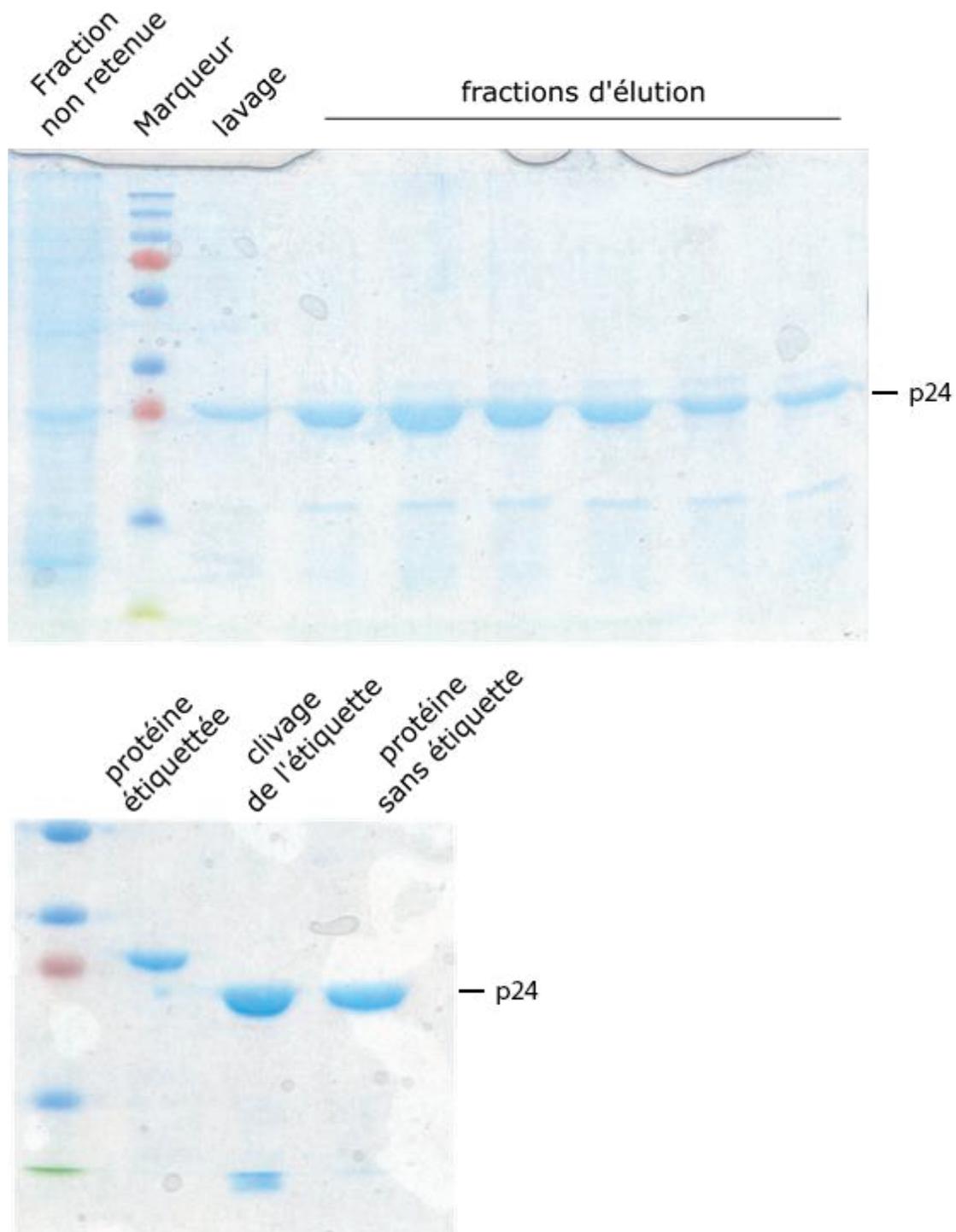


Figure 48 : Purification de la protéine  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , D p24 et élimination de l'étiquette de purification. L'étiquette a un poids moléculaire de 4,2 kDa et migre au niveau du front de migration. La fraction clivée est purifiée par chromatographie d'affinité en ne conservant que la fraction non retenue. La protéine ressort pure, sans l'étiquette de purification.

Une nouvelle expression a donc été réalisée (Figure 49). Trois échantillons à des concentrations de  $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ont été obtenus après purification. Les lots ont été produits dans le même tampon supplémenté à 5 mM de dithiothréitol (DTT) pour assurer la stabilité des protéines en inhibant la formation des ponts disulfures. Ces échantillons se sont avérés effectivement plus stables au cours du temps puisqu'un

seul et même échantillon a permis l'acquisition de la totalité des spectres, tous de bonne qualité pour le traitement des données.

Les séquences conventionnelles d'acquisition des spectres HNC $\alpha$ O, HN(CA)CO, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCA et HN(CO)CA n'ont pas donné de signal suffisant. (Note : le spectre HNCACB donne les mêmes informations que le spectre CBCANH décrit en Figure 47 et ne diffère que par la façon d'acquérir le signal). Nos collaborateurs de l'université de Lille ont donc décidé d'utiliser des séquences d'acquisitions mises au point pour les protéines intrinsèquement désordonnées, supposées augmenter le signal (séquences (3D) BEST-TROSY HNC $\alpha$ O, BEST-TROSY HN(CA)CO, BEST-TROSY HNCACB, BEST-TROSY HN(CO)CACB, BEST-TROSY HNCA et BEST-TROSY HNCOCA) (Gil-Caballero, Favier et Brutscher, 2014 ; Solyom *et al.*, 2013). Les spectres acquis montrent un rapport signal sur bruit bien plus favorable et tous les pics attendus en expérience 3D ont pu être observés sur l'ensemble des spectres, permettant l'attribution séquentielle (Figure 50).

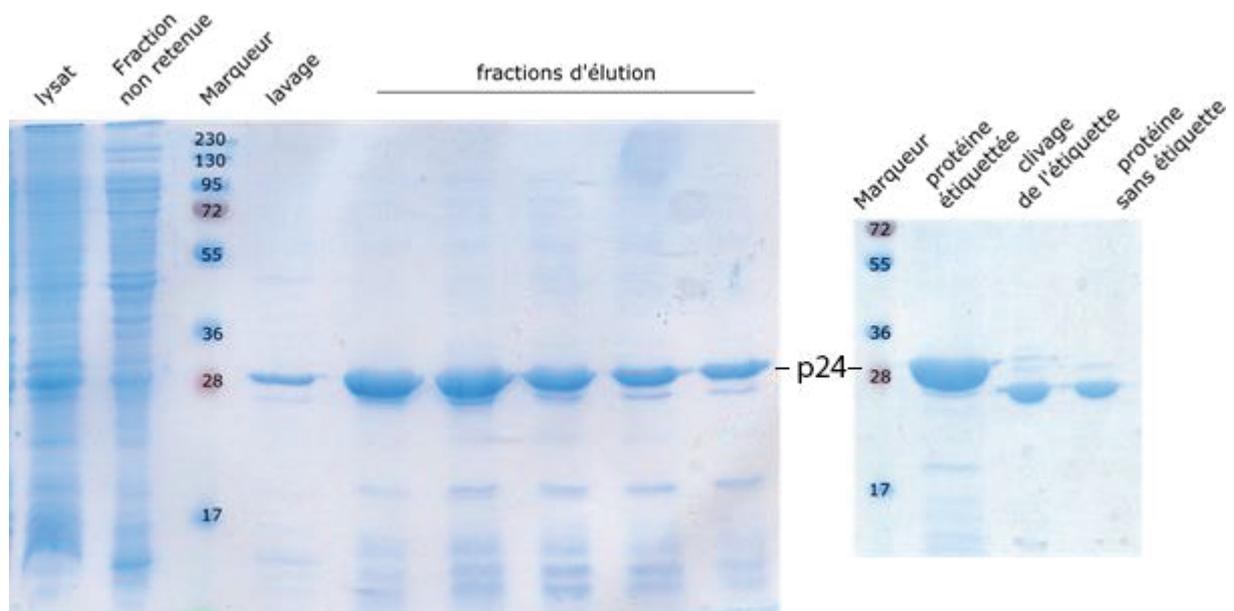


Figure 49 : Production de  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , D p24. La protéine a été éluée, avec des fractions d'élution plus concentrées que précédemment. L'étiquette de purification a été clivée et retirée de la solution par chromatographie d'affinité contre l'étiquette poly-histidine et en ne conservant que la fraction non retenue.

#### d) Attribution séquentielle de la protéine et validation de la qualité de l'attribution

Avec les expériences acquises, seuls les azotes et hydrogènes de la liaison amide, les carbones de la liaison amide et les carbones  $\text{C}_\alpha$  et  $\text{C}_\beta$  des résidus d'acides aminés ont pu être détectés et attribués.

Plusieurs pics ne correspondaient pas à la séquence de la protéine. L'analyse de ces derniers a révélé qu'une partie des pics sur les spectres correspondaient à une fraction marginale d'étiquette clivée restée dans la solution bien qu'elle ne soit plus visible sur gel (voir Figure 48). En effet, le fragment peptidique correspondant à

l'étiquette ayant un poids moléculaire beaucoup plus faible, il est donc possible que la relaxation du signal de ce fragment soit moindre que pour la protéine et que le signal du fragment soit détectable même à des concentrations marginales. *In fine*, la majorité des acides aminés attribuables de la protéine ont cependant été attribués à leurs déplacements chimiques (Figure 51). Le jeu complet de spectres 3D : HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB et HNCANNH, a permis l'attribution séquentielle de la protéine à hauteur de 83 % des NH de la chaîne peptidique (Tableau 8). Les pics correspondant à l'étiquette ont pu être attribués afin de les soustraire des statistiques d'attribution de la protéine et des données d'attribution déposées dans la base de données BRMB (entrée 50794).

Puisque les prolines ne sont pas visibles sur les spectres, la boucle riche en proline est moins bien attribuée que la moyenne, de même que certaines portions d'hélices  $\alpha$  (Figure 52A et Figure 52B). La qualité des spectres n'est pas homogène sur la totalité de la protéine : si certaines régions du spectre sont très résolutes et donnent la totalité des pics (par exemple, des résidus Ile 2 à Val 5 sur la Figure 50), d'autres régions sont très bruitées et moins de pics sont visibles (par exemple, des résidus Ala 96 à Leu 104 sur la Figure 50). Les acides aminés au voisinage de ces régions non attribuées présentent des pics peu résolus et certains d'entre eux sont ainsi absents de l'attribution. Une façon d'expliquer cette baisse du signal au voisinage de ces derniers serait que ces acides soient susceptibles de présenter une certaine flexibilité structurale. Une capacité de multimérisation, même si incomplète, pourrait expliquer également cette baisse, si les hélices moins bien attribuées sont impliquées dans des interactions entre les monomères.

La qualité de l'attribution a été évaluée *via* les différences de déplacements chimiques calculées entre les valeurs observées et les valeurs théoriques des acides aminés en pelote aléatoire. Les différences de valeurs de déplacement du  $C_\alpha$  et du  $C_\beta$  ont été comparées aux structures secondaires observées dans la structure cristalline (Figure 52C). La correspondance entre les structures observées et prédites par les différences de déplacements chimiques valide l'attribution.

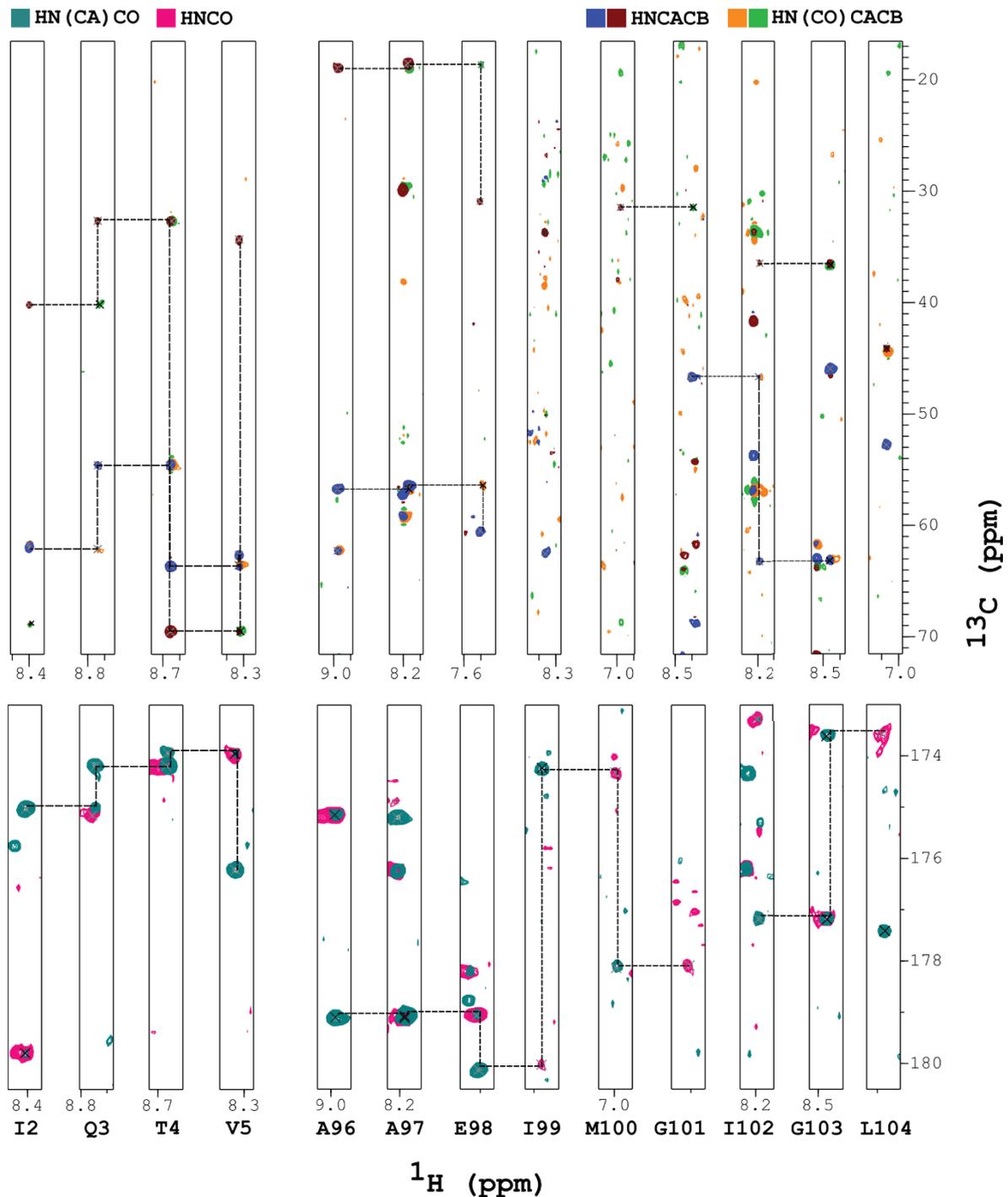


Figure 50 : Attribution séquentielle des pics et qualité des spectres. Le panneau du haut présente des extraits de spectres HNCACB (bleu : valeurs positives, correspondant aux  $\text{C}_\alpha$ , marron aux valeurs négatives, correspondant aux  $\text{C}_\beta$ ) et HN(CO)CACB (jaune : valeurs positives correspondant aux  $\text{C}_\alpha$ , vert : valeurs négatives correspondant aux  $\text{C}_\beta$ ), et le panneau du bas des extraits de spectres HNCO et HN(CA)CO, donnant le C de la liaison amide. Les spectres HNCACB et HN(CO)CA présentent des pics relatifs à l'acide aminé  $i$  et l'acide aminé  $i-1$  et les HN(CO)CACB et HNCACB aux acides aminés  $i-1$ , permettant de reconstruire la chaîne peptidique séquentiellement. La construction séquentielle est indiquée par les pointillés.

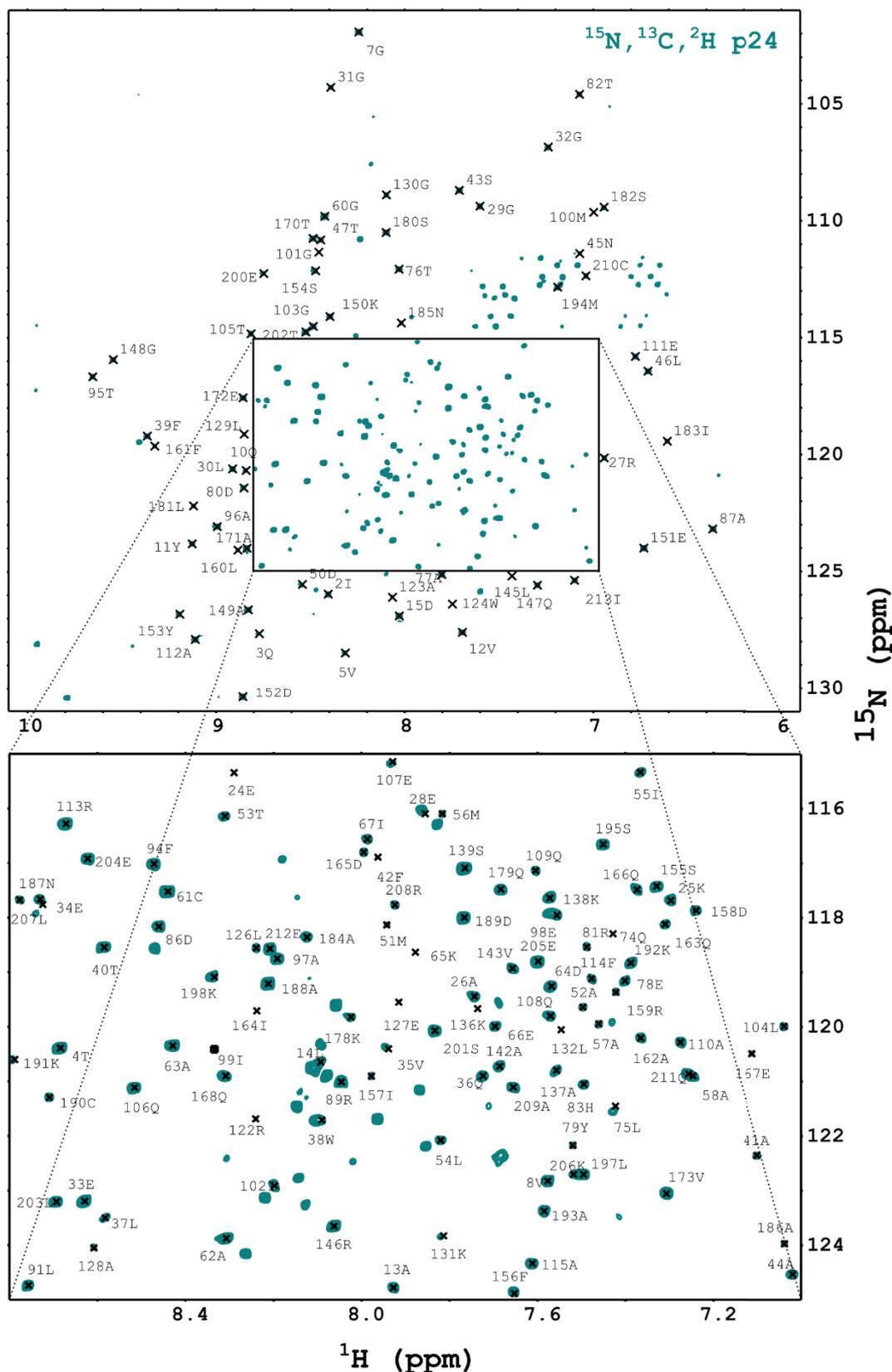


Figure 51 : Spectre 2D HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine triplement marquée D,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  p24, dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM, DTT 5 mM, 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ , avec les attributions des pics sur le spectre.

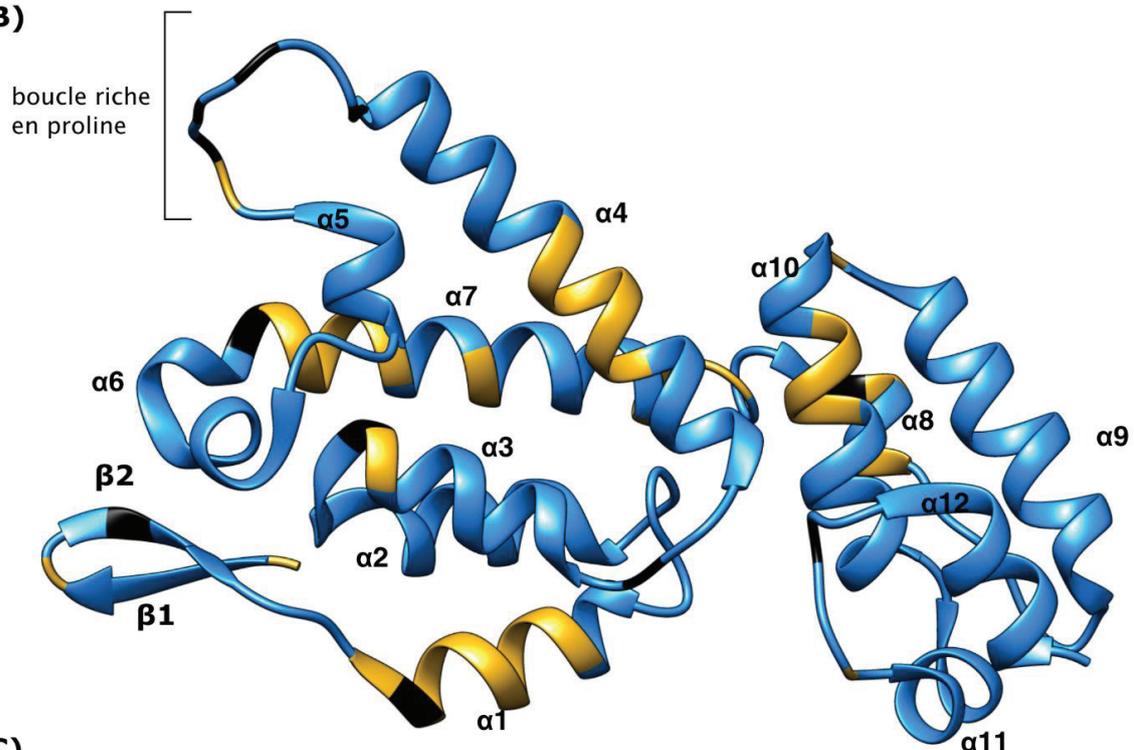
A)

```

1  T I Q T V N G V P Q Y V A L D P K M V S I F M E K A R E G L G G E E V Q L W F T A F S A N L T P T D
51 M A T L I M A A P G C A A D K E I L D E S L K Q L T A E Y D R T H P P D A P R P L P Y F T A A E I M
101 G I G L T Q E Q Q A E A R F A P A R M Q C R A W Y L E A L G K L A A I K A K S P R A V Q L R Q G A K
151 E D Y S S F I D R L F A Q I D Q E Q N T A E V K L Y L K Q S L S I A N A N A D C K K A M S H L K P E
201 S T L E E K L R A C Q E I

```

B)



C)

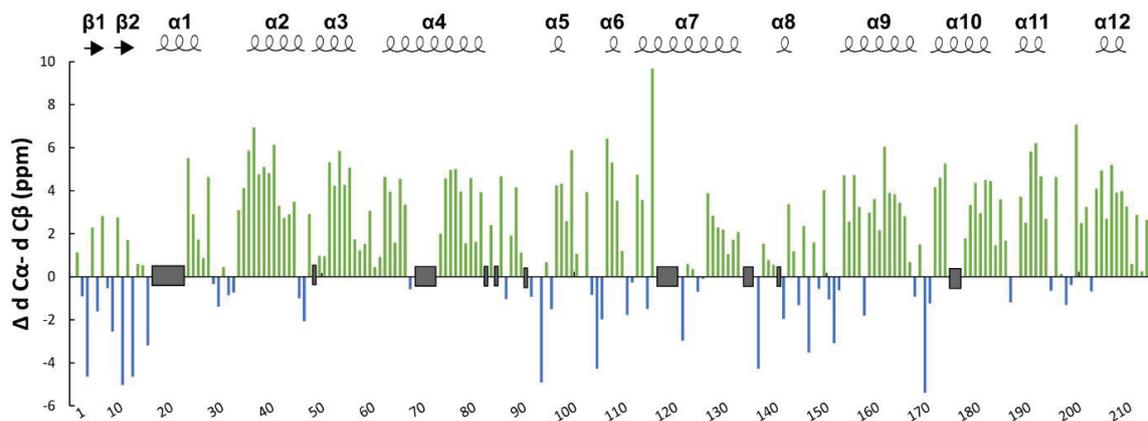


Figure 52 : Qualité de l'attribution de la protéine. A) et B) visualisation des acides aminés attribués sur la séquence (A) et la structure cristalline de référence (B). Les acides aminés attribués sont en bleu, les prolines en noir et les non attribués autres que proline en jaune. Les différentes structures secondaires sont également indiquées. C) Différences de déplacements chimiques des  $C\alpha$  et  $C\beta$  des acides aminés attribués par rapport à leurs valeurs standard dans une pelote aléatoire, sur la séquence entière. Les structures secondaires observées dans la structure cristalline sont indiquées au-dessus. Les zones grisées indiquent les régions dont les acides aminés n'ont pas été attribués.

Tableau 8 : pourcentage d'attribution de la protéine  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  FIV p24.

Catégorie	Total	Assignés	% Assignés
<b>N+H du squelette peptidique</b>	413	334	81 %
<b>Type N</b>	213	167	78 %
<b>Type H</b>	200	167	84 %
<b>Type C</b>	213	184	86 %
<b>Type C<math>\alpha</math></b>	213	185	87 %
<b>Type C<math>\beta</math></b>	204	153	75 %
<b>Tous résidus</b>	213	187	88 %

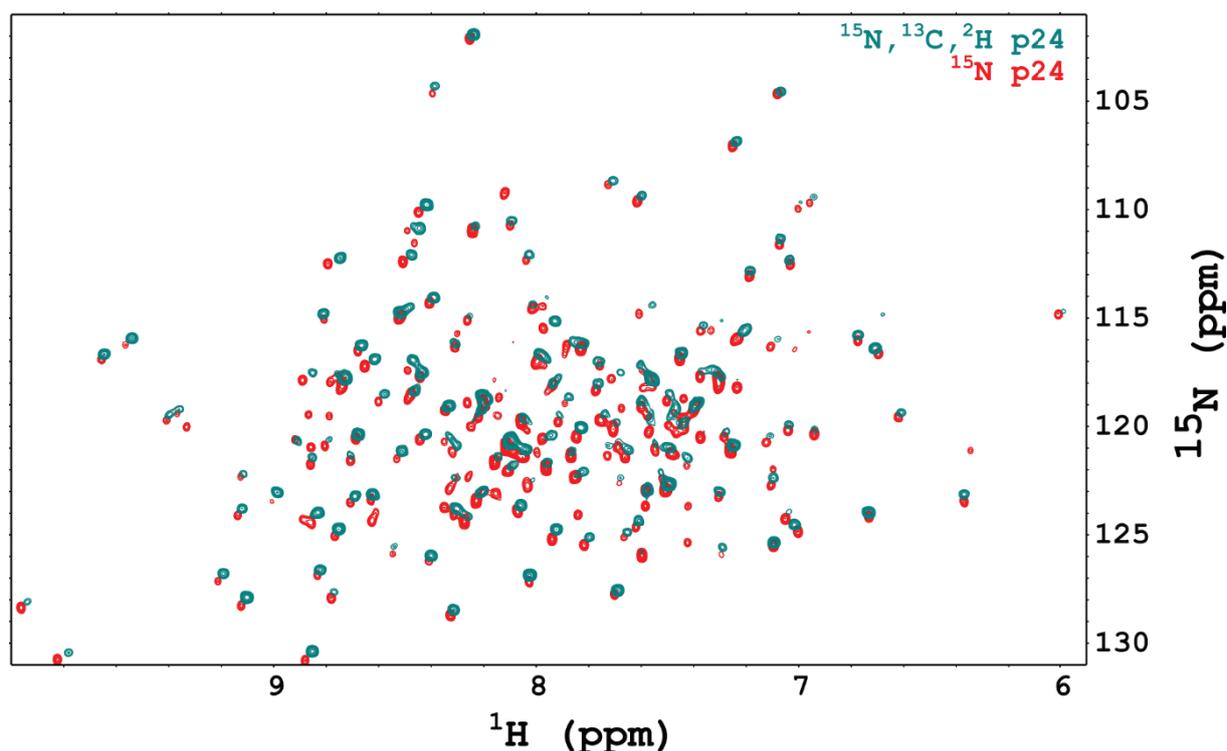


Figure 53 : Effet du deutérium sur les déplacements chimiques. Les deux spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine perdeutérée et de la protéine simplement marquée au  $^{15}\text{N}$  présentent des différences de déplacements chimiques pour chacun des pics.

Avec cette attribution, il est maintenant possible de tester les composés avec des expériences simples comme la  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, qui ne nécessite qu'un simple marquage au  $^{15}\text{N}$ , pour identifier les acides aminés impliqués dans la fixation du ligand en repérant les différences de signal entre les spectres obtenus avec et sans composés. Les valeurs de déplacements mesurées correspondent cependant à celles de la protéine perdeutérée (Figure 51), et les protéines non perdeutérées auront des valeurs de déplacements quelque peu différentes par rapport à l'attribution déposée (Gilbert *et al.*, 2010 ; LeMaster, 1990 ; Maltsev, Ying et Bax, 2012). Il faut ainsi reporter les attributions de la protéine triplement marquée sur les pics de la protéine non deutérée avant de comparer les différences de déplacements chimiques. Comme on peut le voir sur la Figure 53, les différences de déplacements chimiques entre la protéine marquée au deutérium et la protéine

non marquée sont faibles, de l'ordre du dixième de ppm pour la résonance  $^1\text{H}$  et de l'ordre de 1 ppm pour la résonance  $^{15}\text{N}$ . Il n'y pas d'ambiguïté pour l'attribution des pics non marqués au deutérium.

## 2. Identification de composés interférant avec la capsid du FIV

### a) Criblage de composés d'une chimiothèque

Nous avons eu accès, *via* nos collègues en Uruguay (Dr. Guzmán Alvarez, *Laboratorio de Moléculas Bioactivas, Universidad de la República, Paysandú*), à plus de 400 molécules à bas coût de production issues de leur chimiothèque comprenant plusieurs milliers de composés. Ensemble, nous avons pu tester ces molécules contre la capsid du VIH-1 et contre celle du FIV. Nous avons ainsi identifié une molécule d'intérêt interférant avec l'assemblage de FIV p24 et nous avons caractérisé son mode d'interaction, son affinité et son site de fixation sur la protéine.

Les composés ont pu être testés sur celui de la protéine FIV p24, selon le protocole d'assemblage *in vitro* de la capsid déjà mis en place (Sierra *et al.*, 2018). Nous avons ainsi identifié un composé interférant avec l'assemblage de la capsid du FIV, nommé **696** conformément à son identifiant dans la chimiothèque. Le composé **696** fait partie de la famille des benzimidazoles (Figure 54).

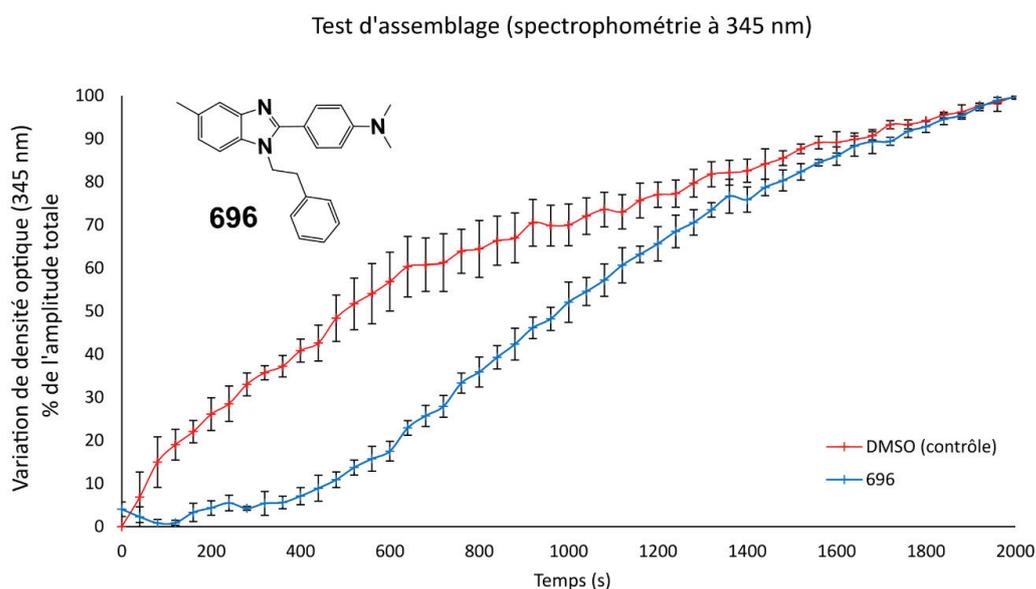


Figure 54 : Test d'assemblage de la protéine FIV p24 entière en présence du composé **696** (bleu) par rapport à la condition contrôle en DMSO sans composé (rouge). Chaque courbe est la moyenne de trois expériences et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

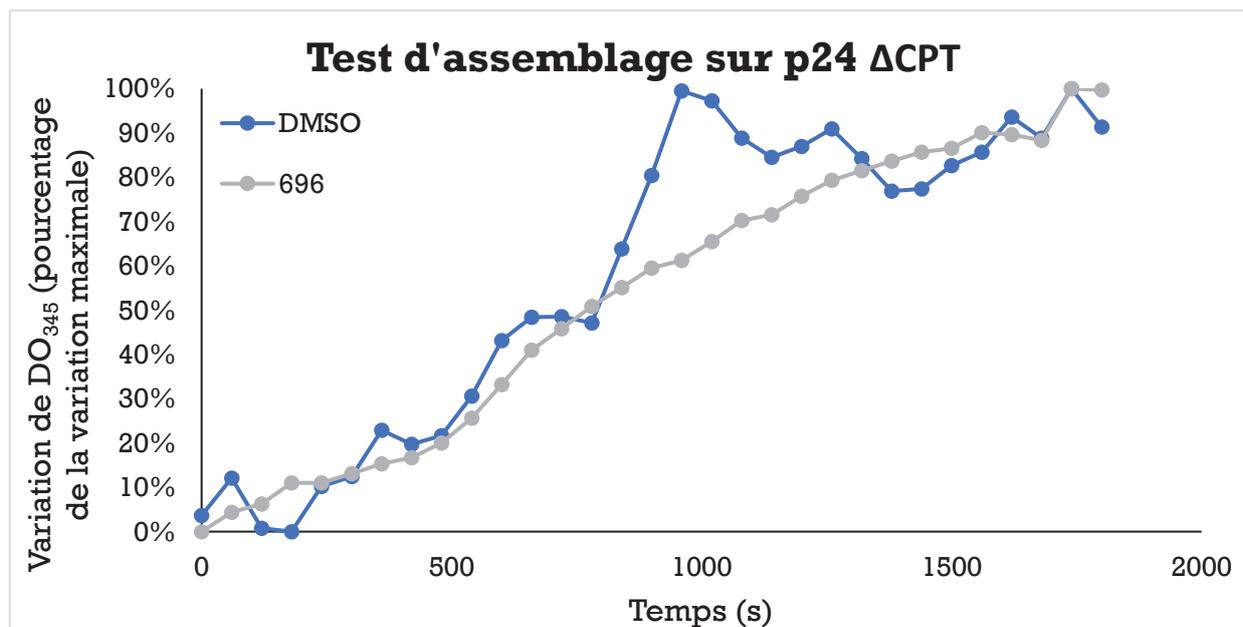


Figure 55 : Test d'assemblage en présence ou en absence de **696** sur la protéine tronquée p24 ΔCPT. Le test a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que le test sur la protéine entière p24E. Le graphe correspond aux résultats d'une expérience.

J'ai fait le test d'assemblage sur la protéine tronquée p24 ΔCPT et la protéine entière p24E PIT (notée p24E dans la suite du manuscrit), à deux concentrations différentes, d'après le protocole mis en place au préalable (Sierra *et al.*, 2018). Brièvement, un échantillon de protéine purifiée, stockée dans un tampon NaP<sub>i</sub> 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM a été mélangé avec un même volume de tampon NaCl 1 M. La forte salinité déclenche l'assemblage de la protéine. L'assemblage a été effectué en présence du composé **696** à une concentration de 200 μM (1 % DMSO final) ou de DMSO pur à 1% final pour le témoin. D'une part, l'assemblage *in vitro* était moins reproductible sur la protéine tronquée que sur la protéine entière (Figure 55) et d'autre part, l'assemblage était plus facilement observé à une concentration de 7 mg.mL<sup>-1</sup> qu'à une concentration de 5 mg.mL<sup>-1</sup> (non montré). Nous avons ainsi utilisé la protéine entière p24E (222 acides aminés) à la concentration de 7 mg.mL<sup>-1</sup> pour les expériences de caractérisation *in vitro* de la molécule avec la protéine. Le composé **696** induit un retard dans la cinétique d'assemblage (Figure 54).

La molécule **696** interfère donc bien avec l'assemblage de la capsid du FIV *in vitro*. L'étape suivante est de caractériser s'il existe bien un site de fixation spécifique de cette molécule, son affinité pour FIV p24 et la valeur de la constante d'interaction.

### b) Analyse de l'interaction entre la protéine FIV p24E et 696

Pour étudier l'interaction entre la protéine de capsid et le composé, nous avons utilisé la thermophorèse sur la protéine p24E monomérique marquée, avec des concentrations croissantes de ligand (Figure 56). Ainsi, l'expérience démontre une

affinité réelle du ligand avec le composé et a permis de déduire une constante de dissociation  $K_D$  estimée à  $101 \mu\text{M} \pm 35 \mu\text{M}$ . Cependant, la nécessité de ne pas dépasser 5% de DMSO dans les capillaires, pour ne pas perturber trop les propriétés du solvant, notamment les propriétés de diffusion, empêche d'atteindre des hautes concentrations de ligand en solution avec la protéine. En conséquence, la mesure est probablement sous-évaluée. L'estimation permet néanmoins d'avoir l'ordre de grandeur de l'affinité.

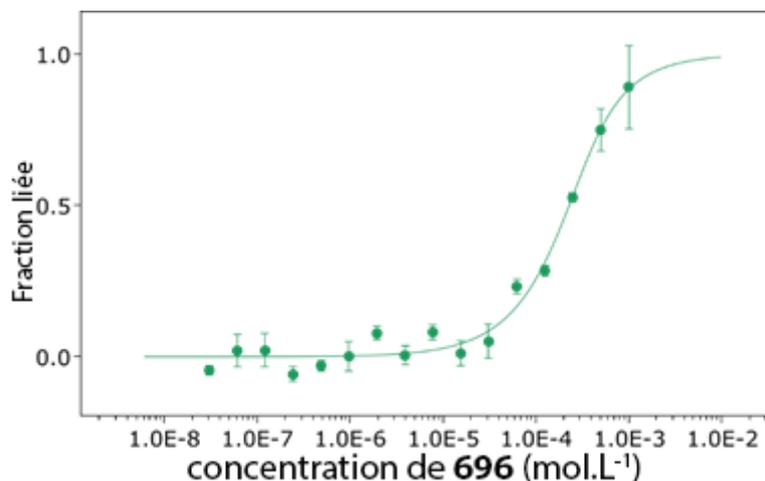


Figure 56 : Quantification de l'interaction p24:696 par thermophorèse. La courbe et les barres d'erreur correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart-type de deux expériences.

Des expériences complémentaires ont été tentées pour affiner la mesure de l'affinité mais elles ont été limitées par les mêmes problèmes de concentration maximale utilisable. La titration calorimétrique isotherme (ITC) a ainsi estimé l'affinité avec un  $K_D$  de  $16 \mu\text{M}$  mais avec de nombreux points aberrants lors de l'ajout croissant du ligand. Ces points ont été retirés lors de la quantification (Figure 57). Il est donc possible que 696 ait une affinité pour p24E monomérique située entre  $10 \mu\text{M}$  et  $100 \mu\text{M}$ .

La présence de ces points aberrants, à des concentrations différentes et aléatoires entre les expériences, est observée à chaque expérience d'ITC réalisée. Des constats sur les résultats de l'expérience et sur le nettoyage de la sonde après expérience nous ont amené à penser que le composé est à sa limite de solubilité dans le tampon aqueux et qu'il y a présence de précipités. Après chaque expérience, lors du nettoyage, nous avons constaté que la sonde semblait partiellement obstruée et que l'injection du tampon de nettoyage était difficile. Cette obstruction pourrait être causée par des particules solides en suspension qui se logeraient dans la sonde et qui pourraient être responsables des points aberrants.

Dans un article dont je suis co-auteur, d'autres composés de la chimiothèque ont pu également être analysés en thermophorèse (Figure 58 (Sierra *et al.*, 2018)). Ces

composés présentent des noyaux aromatiques contenant des atomes d'azote (Figure 59), comme **696**.

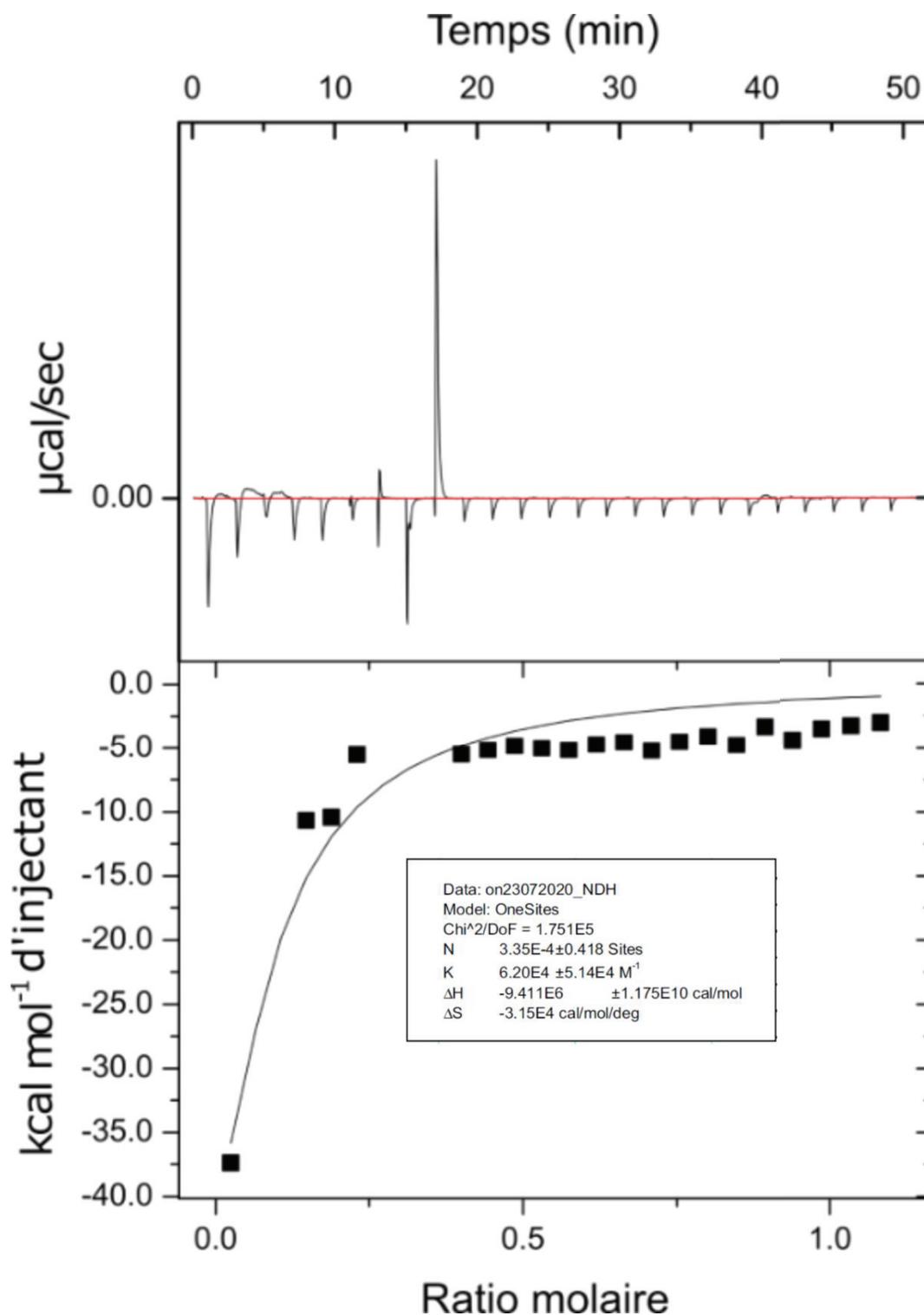


Figure 57 : Quantification de l'interaction p24:**696** par titration calorimétrique isotherme. La courbe du haut est représentative des résultats de 5 expériences différentes, avec toujours au moins un point aberrant. L'encart présente les statistiques de la régression.

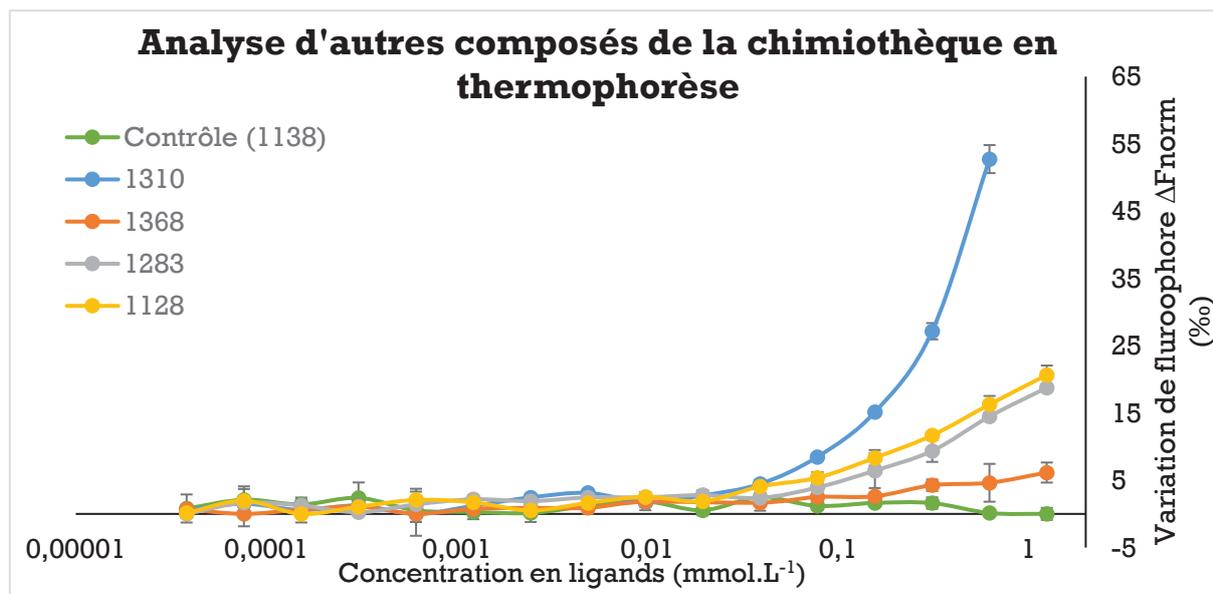


Figure 58 : Étude en thermophorèse d'autres composés à noyaux aromatiques de la chimiothèque. Les courbes et barres d'erreur correspondent respectivement à la moyenne et écart-type de deux expériences. (Sierra *et al.*, 2018).

Un composé testé, **1138**, ne présente pas de variation de signal et semble donc ne pas se fixer sur la protéine. Il sert de contrôle. Les courbes n'atteignent pas de plateau de saturation, comme pour **696** (Figure 56) et ceux-ci ne sont pas extrapolables. Le composé pour lequel l'inflexion de la courbe semble avoir lieu à la plus faible concentration, et donc la meilleure affinité, est le composé **1310** (Figure 58). Mais l'ordre de grandeur de l'affinité est estimé à 1 mM, soit supérieur d'au moins un facteur 10 comparativement à celui de **696**. Celle-ci reste donc la molécule tête-de-liste sur laquelle nous allons nous concentrer.

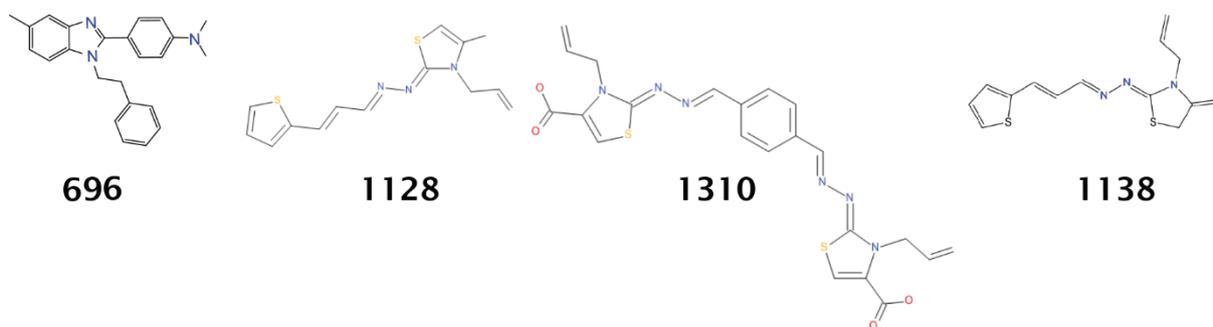


Figure 59 : Structure des molécules testées pour leur interaction pour FIV p24. Les molécules testées portent des noyaux aromatiques contenant des atomes d'azote.

### c) Étude du site d'interaction de **696** et de p24

Connaître le site de fixation fournit des informations utiles pour l'optimisation rationnelle de la molécule. Une co-cristallisation de la protéine en présence de **696** a été réalisée, mais aucun cristal n'a été obtenu. Pour obtenir des informations structurales en absence de structure expérimentale de la molécule avec la

protéine, la RMN fournit des informations utiles par comparaison des déplacements chimiques en HSQC comme expliqué précédemment.

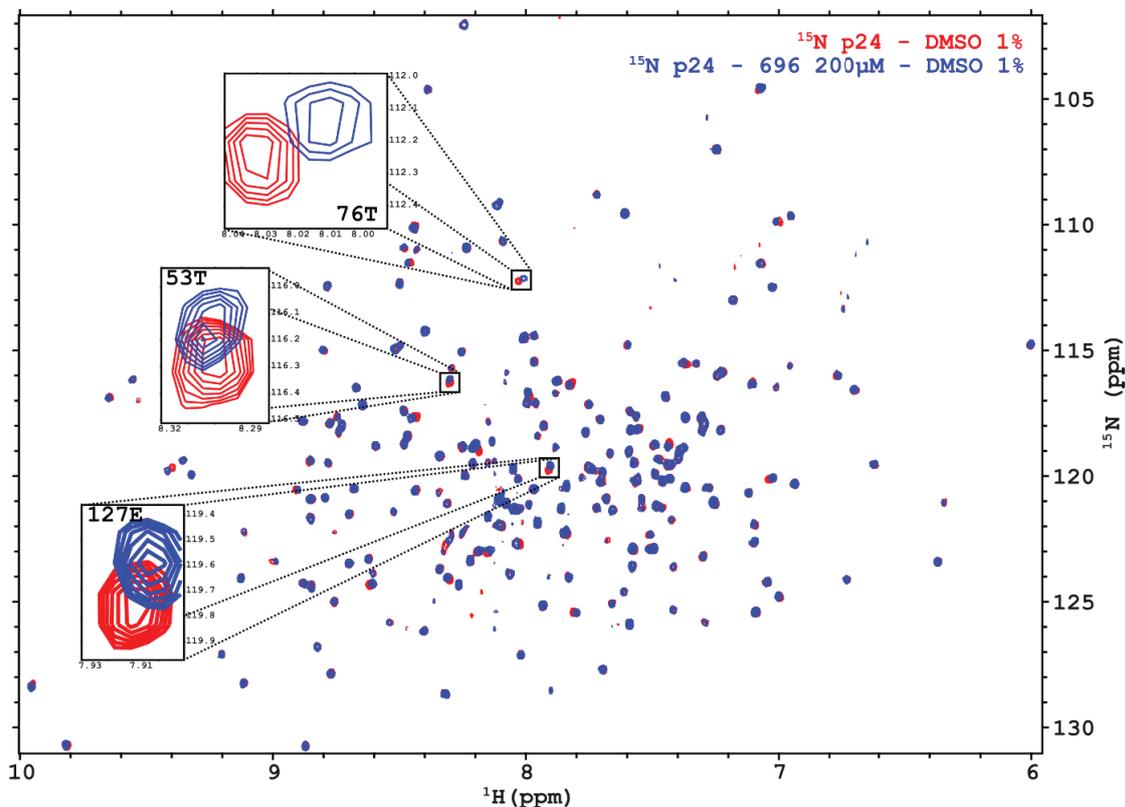


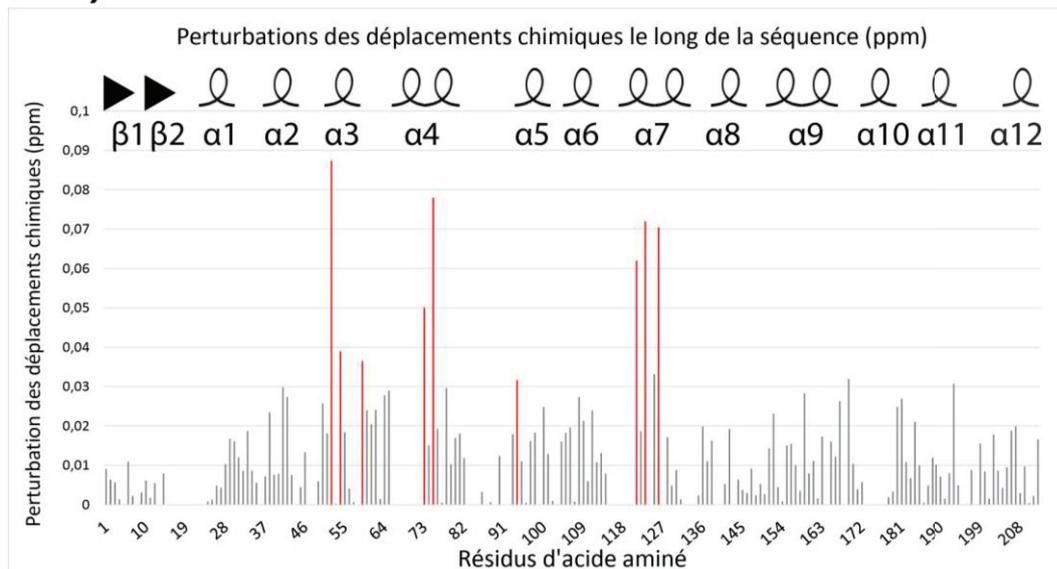
Figure 60 : Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la protéine  $^{15}\text{N}$  - p24 en présence de DMSO seul (contrôle) ou du ligand. Les trois pics qui présentent la plus forte variation de déplacements chimiques sont repérés par des encarts agrandissant la région de spectre de ces pics.

J'ai donc produit des échantillons de p24 marqués au  $^{15}\text{N}$ . Les échantillons finaux étaient à une concentration de  $2,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $90 \mu\text{M}$ ), 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Nous avons rajouté du DMSO dans un échantillon comme contrôle et dans un autre échantillon le composé **696** solubilisé dans le DMSO, amenant la concentration en ligand à  $200 \mu\text{M}$  et en DMSO à 1 %. Les spectres étaient de bonne qualité et ont pu être comparés (Figure 60). Certains signaux diffèrent par la modification des déplacements chimiques et l'intensité des pics sur les deux spectres. De façon globale, l'ajout de DMSO induit une perturbation de tous les déplacements chimiques en augmentant les valeurs des déplacements chimiques sur les deux axes  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$ . L'ajout de **696** quant à lui ne perturbe que certains pics soit en augmentant, soit en diminuant, ces déplacements.

Très peu de pics présentent des perturbations significatives de déplacements chimiques, caractéristiques d'un environnement modifié par la présence du ligand. L'altération de l'environnement de ces résidus peut résulter du fait qu'ils sont soit directement impliqués dans l'interaction avec le ligand, soit que la fixation des ligands induit des réajustements structuraux comme des déplacements de boucles

flexibles.

A)



B)

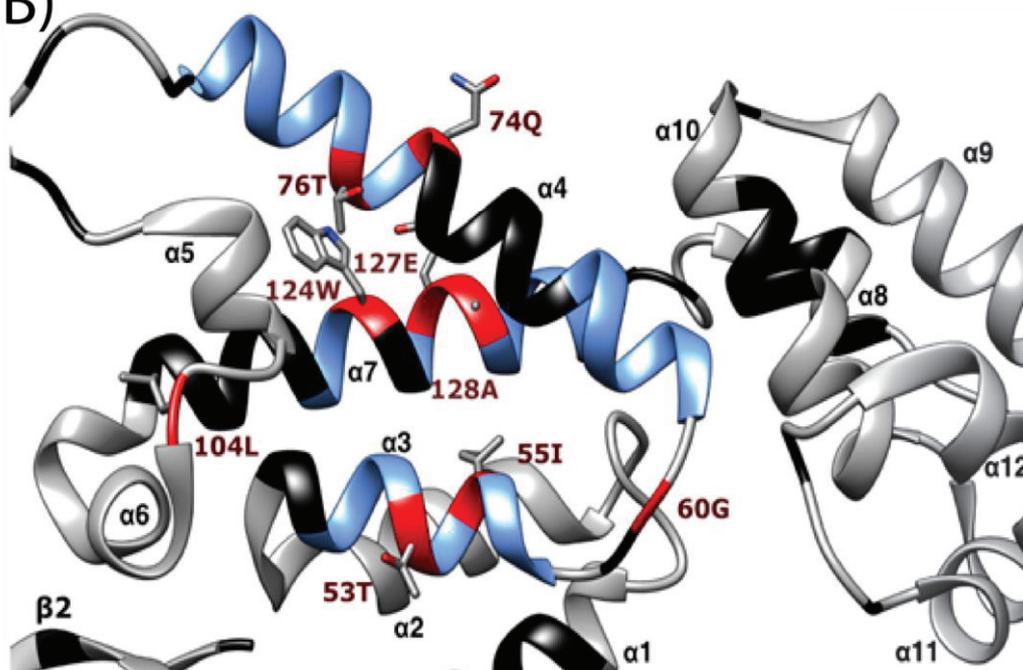


Figure 61 : Quantification des perturbations de déplacements chimiques sur la protéine. A) Quantification des perturbations (*Chemical Shift Perturbations, CSP*) le long de la séquence peptidique. Les neuf acides aminés dont les perturbations sont les plus fortes sont indiqués en rouge. Les structures secondaires sont indiquées en haut du graphe. B) Mise en évidence des acides aminés identifiés préalablement (en rouge). Ces acides aminés colocalisent au niveau des hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$  (en bleu) et définissent ainsi un site spécifique de fixation. Les acides aminés en noir ne sont pas attribués.

Le faible nombre d'acides aminés montrant des perturbations de déplacements chimiques suggère une interaction sur une zone définie, ce qui rend possible l'exploitation de ces données pour identifier le site d'interaction. Les perturbations de déplacements ont été quantifiées et les neuf acides aminés aux perturbations les plus intenses sont indiqués (Figure 61A). Ces derniers définissent un site de fixation au niveau des hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$  qui forment une poche dans laquelle pourrait interagir **696** (Figure 61B). Malheureusement, cette région correspond également à une région avec une abondance d'acides aminés non attribués, certains résidus directement impliqués dans la liaison du ligand peuvent donc ne pas apparaître. Cependant, le rôle des trois hélices dans la formation d'une poche dans laquelle pourrait se glisser le ligand ressort sans équivoque de l'expérience.

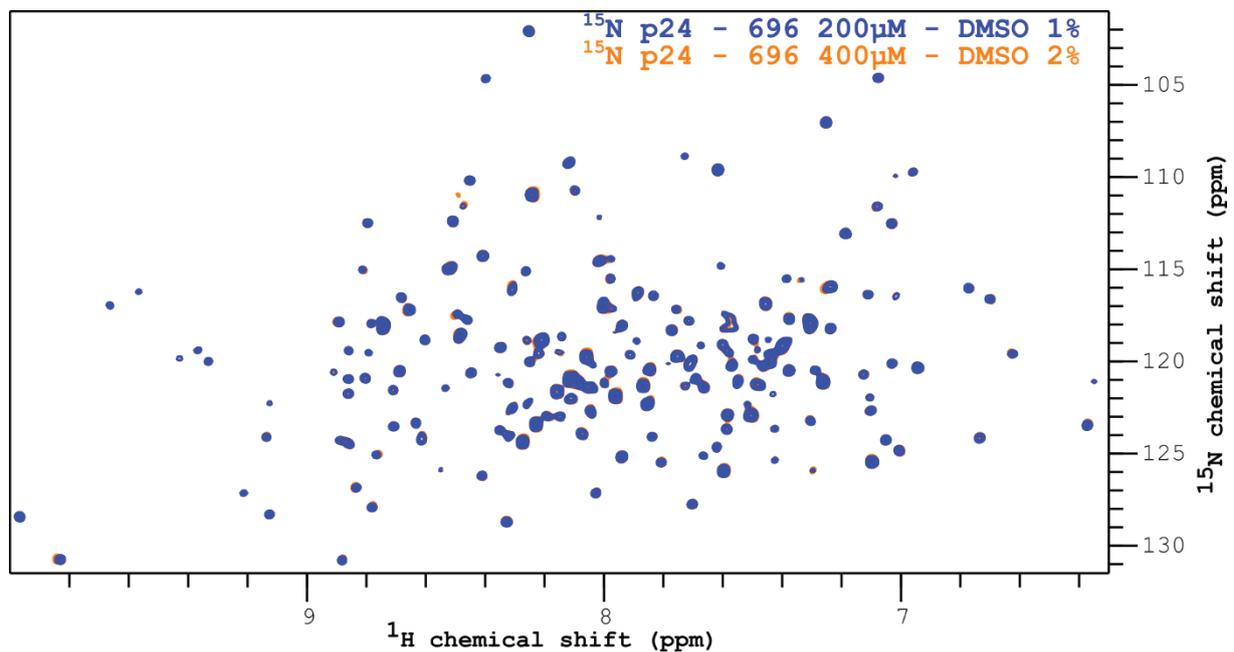


Figure 62 : Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de  $^{15}\text{N}$ -p24 avec 200  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$  de **696**.

Une acquisition HSQC à une plus forte concentration du composé **696**, à 400  $\mu\text{M}$ , a également été réalisée (Figure 62). Il n'y a pas de déplacements chimiques supplémentaires qui soient visibles, ni de variations significatives dans les intensités des pics. Ces résultats laissent penser qu'à 200  $\mu\text{M}$ , la majorité des protéines en solution était déjà saturée en ligand. Cette hypothèse n'est toutefois pas compatible avec l'affinité de 100  $\mu\text{M}$  mesurée par thermophorèse, pour laquelle le calcul montre que la protéine est liée au ligand à hauteur de 59 % à 200  $\mu\text{M}$  et à 77 % à 400  $\mu\text{M}$ . Des variations seraient alors théoriquement visibles sur les spectres, ce qui n'est pas le cas. Deux possibilités peuvent expliquer cette observation : soit, que le ligand **696** est à la limite de solubilité et que la concentration réelle de la solution soit inférieure à la concentration théorique ; ou bien que l'affinité mesurée en thermophorèse soit nettement sous-évaluée. Cela ne remet cependant pas en cause l'existence d'un site spécifique de fixation de **696**.

d) Modélisation de la fixation de 696 sur FIV p24 par docking moléculaire

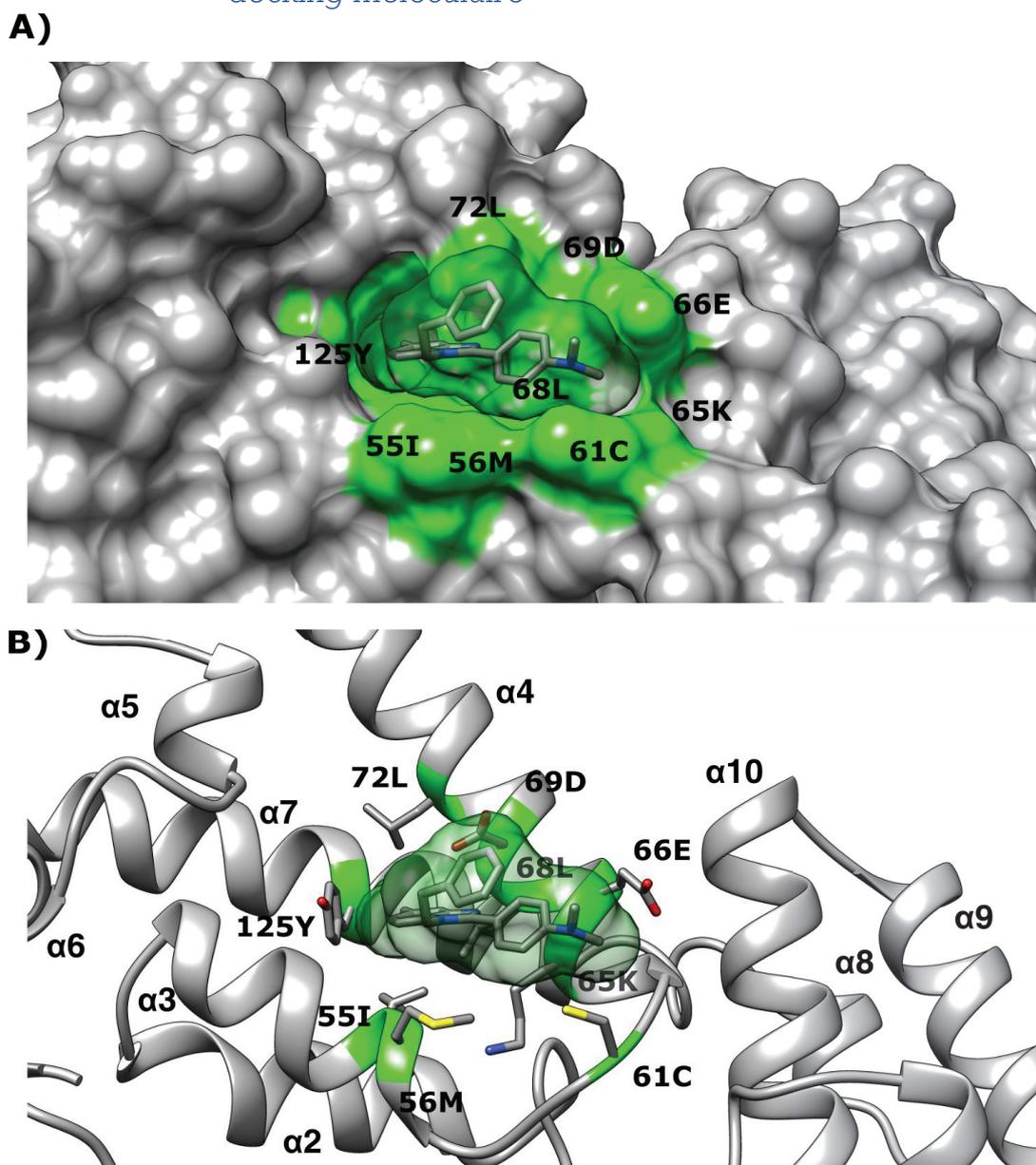


Figure 63 : A) et B) Modèle atomique de positionnement de la molécule 696 sur la protéine p24. Les acides aminés identifiés par Ligplot+ interagissant avec le composé sont numérotés et indiqués en vert sur la structure.

À partir du site spécifique d'interaction mis en évidence par RMN, formé par les trois hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$ , le Dr Xavier Robert de notre équipe a réalisé une modélisation de la fixation du composé sur la protéine par *docking* moléculaire. Le logiciel employé (AutoDock Vina) a ainsi traité la chaîne peptidique comme rigide, sauf au niveau de la zone identifiée où les chaînes latérales étaient considérées comme flexible. Le composé était lui aussi traité comme flexible. Le programme permet d'explorer l'espace conformationnel du ligand et de sa cible dans le but de déterminer les conformations d'interaction les plus probables. Une méthode basée

sur un score permet de classer les poses obtenues. Ce dernier consiste en l'estimation des variations standard d'enthalpie libre associées à la fixation du composé sur la protéine en fonction du site de fixation et de l'orientation des radicaux de la zone traitée comme flexible. Le modèle le plus probable issu de l'expérience de *docking* a été ensuite analysé par le programme Ligplot+ (Laskowski et Swindells, 2011) pour identifier les acides aminés interagissant avec la molécule.

Les acides aminés établissant des liaisons hydrogène ou contacts hydrophobes sont indiqués (Figure 63). Le modèle prédit une affinité du composé avec un  $K_D$  de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ . Cette affinité est compatible avec les résultats de l'ITC mais diffère d'un ordre de grandeur avec les mesures expérimentales de thermophorèse. Elle expliquerait également l'absence de différence en RMN entre le passage de 200 à 400  $\mu\text{M}$ .

#### e) *Caractérisation de la fixation et de la solubilité du ligand 696 par STD*

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la zone de fixation du ligand, nous avons essayé une expérience RMN de différence de saturation par transfert (*Saturation Transfer Difference, STD*) (Bhunia, Bhattacharjya et Chatterjee, 2012), et plus précisément du *STD epitope group mapping*. L'expérience RMN consiste à regarder la différence de signal des protons du ligand entre avant et après interaction avec la protéine. Les protons dont le signal est atténué sont impliqués dans l'interaction avec la protéine. Cela permettrait de vérifier le modèle de fixation du ligand sur la protéine en s'assurant que les protons que nous proposons comme interagissant avec la protéine sont en adéquation avec les résultats expérimentaux. Cette expérience de RMN a été réalisée à nouveau par nos collègues de l'université de Lille sur le spectromètre à 900 MHz équipé d'une cryosonde. L'interaction a été testée dans le même tampon  $\text{NaP}_i$  que celui utilisé pour les expériences de perturbations des déplacements chimiques (voir la partie II.B.2.c), page 97), avec l'eau  $\text{H}_2\text{O}$  remplacée par de l'eau lourde  $\text{D}_2\text{O}$ . Les résultats sont présentés sur la Figure 64.

Le signal STD mesuré entre la protéine et le tampon sert de contrôle pour ne garder que les protons présentant une variation par rapport à celles du tampon. L'expérience a identifié ainsi 6 protons aromatiques impliqués dans l'interaction protéine:ligand. Cependant, le signal présente un mauvais rapport signal/bruit. L'intensité du signal  $^1\text{H}$  du composé 696 dans le tampon aqueux est particulièrement faible pour une concentration théorique attendue de 400  $\mu\text{M}$ . La concentration effective du composé est donc probablement inférieure.

Cela est en accord avec les doutes sur la mauvaise solubilité du composé constatée lors des expériences d'ITC (voir la partie II.B.2.b), page 94 et Figure 57 page 96). Le composé a probablement atteint son seuil de solubilité et la concentration effective en solution est inférieure aux 400  $\mu\text{M}$  attendus, ce qui biaise les résultats à la fois pour la mesure d'affinité en ITC et pour les expériences de STD, données qui ne sont donc pas concluantes.

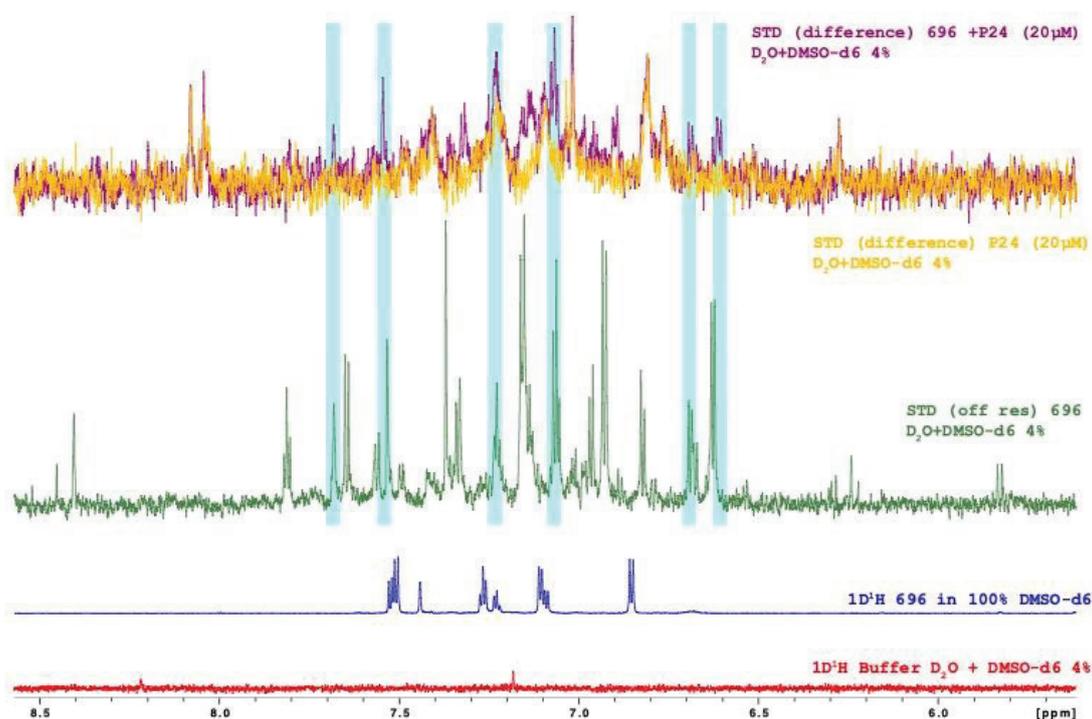
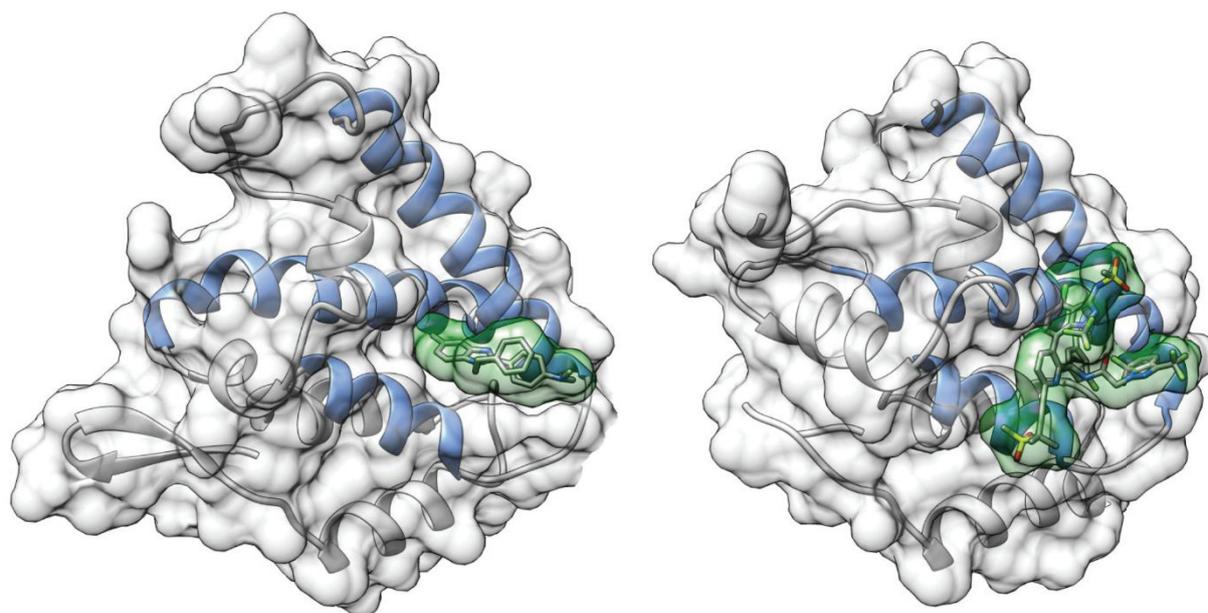


Figure 64 : Expérience de STD entre le ligand **696** et la protéine p24  $\Delta$ CPT. La figure présente les déplacements chimiques du proton  $^1\text{H}$  (zone des protons aromatiques entre 6 et 8.5 ppm) du tampon  $\text{NaP}_i$  DMSO- $d_6$  4 % (rouge), de **696** seul dans le DMSO- $d_6$  (bleu), de **696** dans le tampon  $\text{NaP}_i$  DMSO- $d_6$  4 % (vert), la différence de signal STD de la protéine dans le tampon  $\text{NaP}_i$  DMSO- $d_6$  4 % (jaune) et la différence de signal STD de la protéine et de **696** en solution dans le tampon  $\text{NaP}_i$  DMSO- $d_6$  4 % (violet). Les zones surlignées en bleu indiquent les protons de **696** présentant une différence de signal STD lors de l'expérience protéine:ligand. La figure a été créée par le Dr Xavier Hanouille.

### 3. Caractérisation du potentiel thérapeutique du ligand 696

#### a) *Le site identifié est d'intérêt thérapeutique*

Le site de fixation du composé **696** identifié par *docking* moléculaire (voir la partie II.B.2.d) page 101, Figure 63), a retenu notre attention. Le composé se fixe dans une poche définie par les hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$ , ce qui est particulièrement intéressant lorsque comparé avec p24 du VIH-1. En effet, ce site correspond au site d'interaction de VIH-1 p24 avec de nombreux partenaires cellulaires, comme les nucléoporines 153 et 358 (Nup153 (entrée PDB 4U0C) et Nup358) ou le facteur CPSF6 (entrée PDB 4U0A) (Price *et al.*, 2014). De plus, des molécules d'intérêt thérapeutique contre le VIH-1 comme PF74 (entrée PDB 4U0E) ou un de ses dérivés, GS-6207 (nom commercial Lenacapavir) (entrée PDB 6V2F) ciblent également la même zone (Link *et al.*, 2020 ; Price *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2019) (Figure 65).



FIV p24 - 696

VIH-1 p24 - GS-6207

Figure 65 : Le composé **696** fixe le site homologue de FIV p24 que GS-6207 sur VIH-1 p24. Les deux composés se fixent dans une poche délimitée par les hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$  (en bleu sur les deux structures). (VIH-1 p24 – S-6207 : entrée PDB 6V2F (Link *et al.*, 2020)).

*b) Le composé 696 stabilise les capsides de FIV p24*

Puisque le composé **696** se fixe sur FIV p24 sur la zone homologue de la zone de fixation de GS-6207 sur VIH-1 p24, et que le composé GS-6207 stabilise la capside et inhibe ainsi son désassemblage (Bester *et al.*, 2020), nous avons testé si le composé **696** présentait des propriétés similaires de stabilisation de l'assemblage de la capside du FIV. Les particules obtenues lors du test *in vitro* d'assemblage (voir la partie II.B.2, page 93 et Figure 54 page 93), formées en présence de **696** ou non, ont donc été récupérées pour quantifier la cinétique de désassemblage de ces particules.

Les particules formées ont été récupérées par sédimentation puis resuspendues dans un tampon peu salin pour initier le désassemblage. Des aliquots de cette resuspension ont été prélevés à différents temps puis déposés sur gel d'acrylamide dénaturant, permettant de comparer les quantités de protéines restant assemblées en particules au cours de l'expérience (Figure 66). L'analyse des fractions sur gel montre que les particules formées en présence de **696** sont plus stables dans le temps que celles formées sans. En effet, on observe un maintien d'une partie des particules formées en présence de **696**, 32h après resuspension dans le tampon de désassemblage alors que les particules formées en absence de **696** ont disparu au même temps. Le composé semble ainsi stabiliser la capside de FIV tout comme le composé GS-6207 stabilise la capside du VIH-1. Aussi, par analogie avec GS-6207 pour le VIH-1, le composé **696**, ou des dérivés de celui-ci, semblent prometteurs comme agent thérapeutique visant à inhiber les fonctions de la capside du FIV.

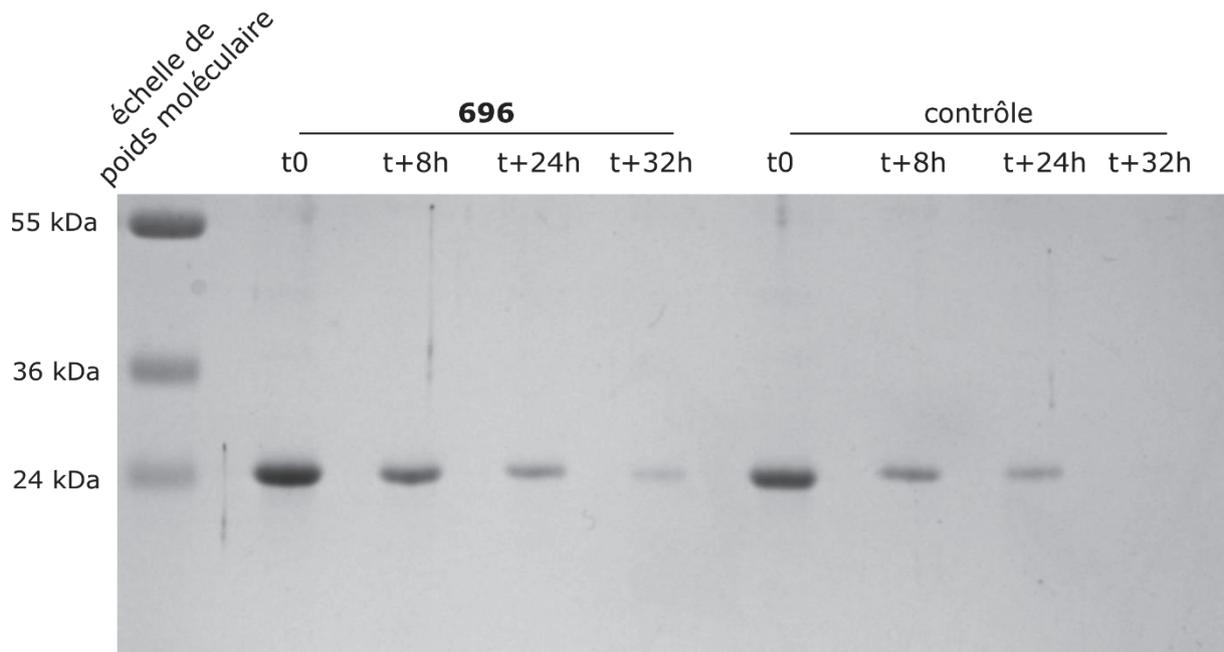


Figure 66 : Cinétique de désassemblage des particules de FIV p24 assemblées en présence de **696** ou sans. Les particules formées ont été collectées puis resuspendues dans un tampon peu salin déstabilisant l'assemblage. Des aliquots ont été prélevés à différents temps et les particules restant en suspension ont été collectées puis déposées sur gel SDS-PAGE pour étudier leur évolution au cours du temps.

#### 4. Analyse de la fixation des peptides cellulaires ciblant les hélices $\alpha 3$ , $\alpha 4$ et $\alpha 7$

##### a) *Les équivalents félins des partenaires cellulaires de VIH p24 interagissent également avec FIV p24*

Dans le cas du VIH-1, la fixation du composé inhibiteur GS-6207 non seulement stabilise la capsid, mais de plus entre en compétition pour les interactions de p24 VIH-1 avec Nup153 et CPSF6 (Bester *et al.*, 2020 ; Rossi *et al.*, 2021). Puisque notre composé **696** cible la même région que GS-6207 sur VIH-1 p24, nous avons voulu tester si les protéines félins homologues aux protéines cellulaires humaines fixant la capsid du VIH-1 interagissaient avec FIV p24 de la même façon. Nous avons donc vérifié *ab initio* si une interaction de Nup153 féline sur le même site était possible, comme c'est le cas sur la protéine p24 du VIH-1.

Grâce aux entrées PDB 4U0C et 4U0E montrant les interactions entre VIH-1 p24 et des fragments de Nup153 (Figure 67) et de CPSF6 (non montré), nous avons pu modéliser les sites d'interaction entre FIV p24 et, respectivement, Nup153 félin (Figure 67) et CPSF6 félin. Pour ce faire, nous avons aligné les séquences des peptides de Nup153 et de CPSF6 humaines avec celles de Nup153 et de CPSF6 de *Felis catus* (entrées Uniprot M3WFC8\_FELCA et M3VZ97\_FELCA). L'homologie de séquence est de 88 % pour Nup153 et de 100 % pour CPSF6. Puis nous avons superposé les structures de FIV P24 et de HIV P24 et modélisé les sites d'interaction. Aucune gêne stérique majeure n'a été observée.

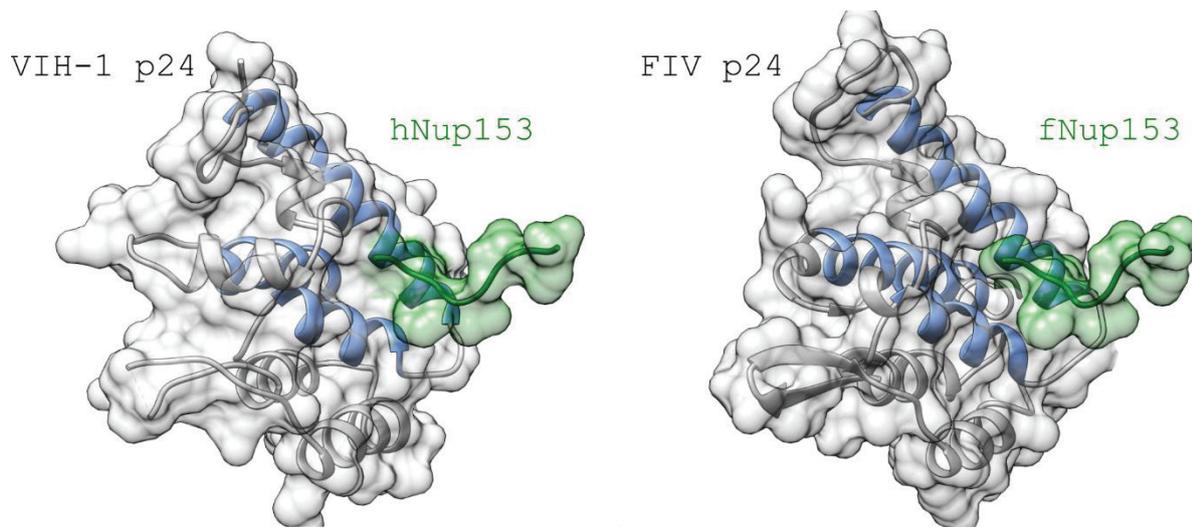


Figure 67 : Interactions de Nup153 humain ou félin au niveau du site identifié de fixation du composé. Les trois hélices  $\alpha$  de VIH-1 p24 impliquées dans la fixation de GS-6207 sont capables d'interagir avec Nup153 humaine (entrée PDB 4U0C).

L'ensemble de ce travail de RMN, incluant l'attribution, l'identification de la zone de fixation du composé **696**, la modélisation de la fixation par docking moléculaire et la comparaison avec GS-6207 a été publié dans un article où je suis premier auteur (Long *et al.*, 2021).

#### b) Quantification de l'affinité des peptides pour FIV p24

Nous avons donc fait synthétiser les fragments peptidiques de CPSF6 et Nup153 félin *in vitro*, pour pouvoir étudier leurs interactions avec FIV p24. Ils correspondent aux fragments peptidiques suivants :

- fCPSF6 : PVLFPQGQPFQGP
- fNup153 : NPSGVFTFG

La synthèse a été réalisée par la plateforme *Protein Science Facility* (PSF) de l'IBCP. Les rendements de synthèse ont été excellents et ont permis de réaliser de nombreux essais d'interactions protéine:ligand à différentes concentrations de ligand, tout en respectant les limites de solubilité de ces peptides dues à leur haute teneur en acides aminés hydrophobes, avec une abondance de prolines pour CPSF6, et le motif phénylalanine-glycine commun aux nucléoporines, pour Nup153.

Dans un premier temps, une solution de peptide à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de chaque a été préparée depuis les poudres de peptides, soit une concentration initiale de  $1,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  et  $0,78 \text{ mmol.L}^{-1}$  pour respectivement Nup153 et CPSF6. Nous avons testé l'interaction entre la protéine et chacun des deux composés par thermophorèse. Une interaction a été détectée entre la protéine et avec les deux peptides CPSF6 et Nup153 (Figure 68). L'expérience consistait à simplement observer la différence de mobilité de la protéine dans le capillaire entre avec et sans ligand, à une concentration finale de  $540 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $390 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Nup153 et CPSF6, respectivement.

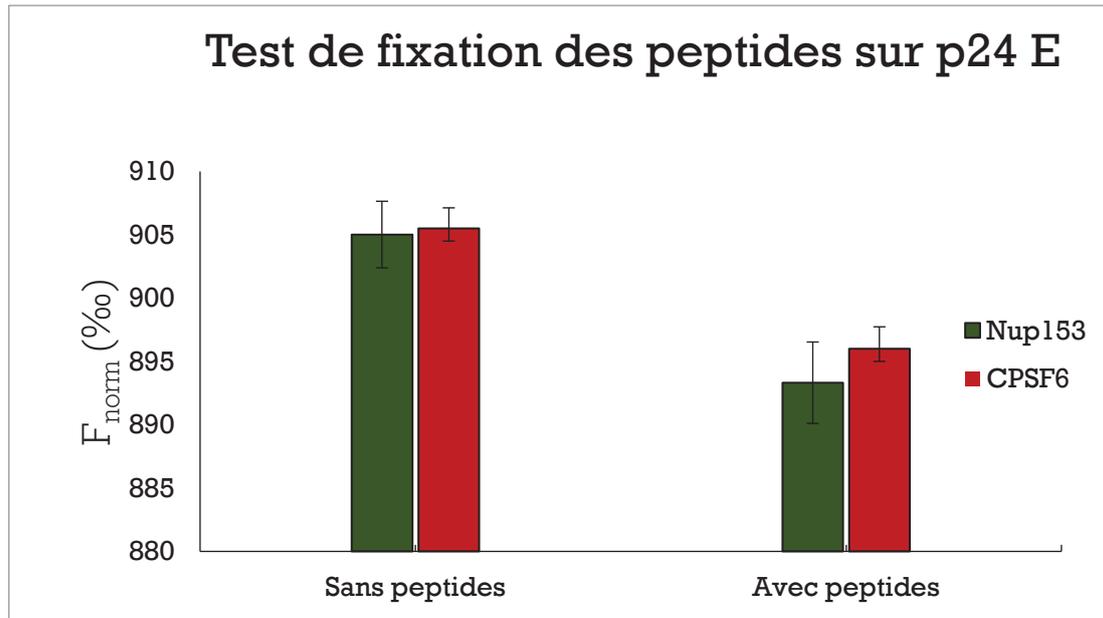


Figure 68 : Test d'interaction entre p24E et les deux peptides Nup153 et CPSF6 par thermophorèse. Les données et barres d'erreur correspondent à la moyenne et écart-type de deux expériences de tests de fixation.

La différence de signal était légèrement plus importante avec Nup153 qu'avec CPSF6, mais les écarts-types entre les expériences étaient plus faibles avec CPSF6. Nous avons choisi de travailler en priorité sur le peptide CPSF6. La thermophorèse a pu estimer l'affinité du peptide pour la protéine (Figure 69). L'expérience montre une interaction spécifique du peptide fCPSF6 pour FIV p24 avec une affinité évaluée à un  $K_D$  de  $80 \mu\text{M} \pm 31 \mu\text{M}$ .

De la même façon que lors du test de **696**, il manque quelques points à forte concentration pour terminer le plateau et ainsi obtenir une mesure fiable de l'affinité. Il faut donc atteindre une plus forte solubilité en peptides. Nous avons donc tenté de solubiliser ces derniers à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . L'entièreté des peptides dans chaque condition, fCPSF6 et fNup153, semble solubilisée malgré la présence des prolines et motifs phénylalanine-glycine (FG). Aussi, il sera possible de tester des interactions protéine:ligand à plus forte concentration de peptide, ce qui n'a pas encore été testé à ce jour.

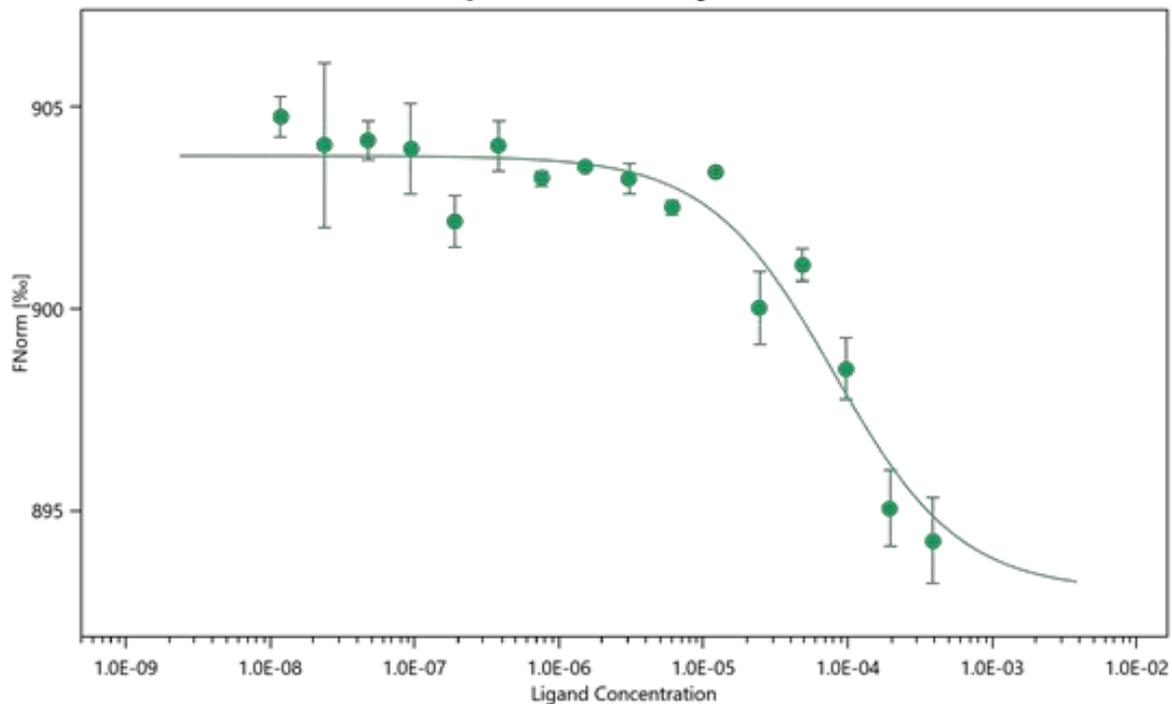


Figure 69 : Quantification de l'interaction FIV p24:fCPSF6 par thermophorèse (barres d'erreurs : écart-moyen, n=2).

*c) Analyse structurale par cristallogénèse du complexe protéine-peptide*

L'approche structurale des complexes p24 FIV:peptides aura deux buts : valider le site de fixation des peptides sur la protéine p24 FIV monomérique d'une part, et d'autre part aider à résoudre la structure de l'hexamère. En effet, si les peptides se comportent de la même façon que ceux ciblant les hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$  de VIH-1 p24 et stabilisent l'assemblage des hexamères, alors il est possible que l'interaction FIV p24:peptide fasse de même. Le résultat serait alors double : d'une part, autoriser l'identification du site d'interaction protéine:ligand, et donc faciliter l'optimisation de composés stabilisateurs de la capsid, et d'autre part résoudre la structure de l'hexamère.

*(i) Expression des protéines mutantes p24E A41C/T53C et p24E A41C/T53C/C61S*

Pour accroître la probabilité de cristallogénèse, nous avons décidé de reproduire la stratégie de formation des ponts disulfures inter-chaînes, en co-cristallisation avec les ligands peptidiques.

Puisque la protéine p24E montrait un meilleur comportement pour l'assemblage que la protéine tronquée p24  $\Delta$ CPT (voir la partie II.B.2 page 93), les mutations de substitutions des résidus en cystéine, réalisées sur la protéine tronquée (voir la partie II.A.3.b), page 60) ont été reproduites sur la protéine entière pour maximiser les chances d'obtenir un assemblage hexamérique stable. J'ai ainsi construit les protéines mutantes p24E A41C/T53C, p24E A13C/A44C, p24E A41C/T53C/C61S (p24E ATC) et p24 A13C/A44C/C61S (p24E AAC).

Le double mutant p24E A41C/T53C a pu être exprimé et purifié en utilisant le même protocole que pour les mutants précédents, p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C. En revanche, la protéine p24E ATC n'est que très peu exprimée si ce n'est pas du tout en utilisant le même protocole, puisqu'elle n'est peu ou pas détectée, même dans le lysat brut, après une immunodétection sur membrane (*Western blot*) avec un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine (Figure 70).

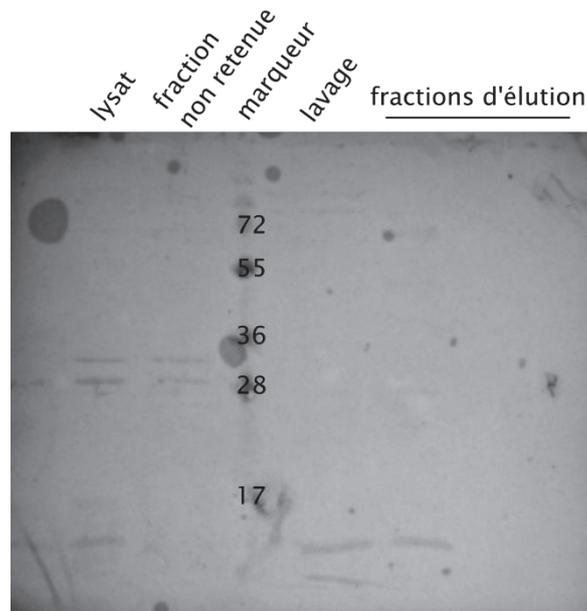


Figure 70 : Immunodétection sur membrane de la protéine p24E ATC dans la fraction de lysat, fraction non retenue, fraction de lavage et les fractions d'élution lors d'une purification.

Aucune bande n'est détectée dans les fractions d'élution et les bandes initiales sont très peu intenses. Des changements dans le protocole d'expression ont été testés, notamment des changements de température d'induction de l'expression, dans la concentration de l'inducteur et les temps d'induction, mais aucun n'a permis l'expression de la protéine et sa purification. Cette protéine triple mutante n'a donc pas pu être utilisée pour la cristallogénèse.

#### (ii) Co-cristallogénèse des ligands peptidiques et de p24E A41C/T53C

Des expériences de co-cristallisation de p24E A41C/T53C avec fCPSF6 ont ainsi été lancées : considérant le  $K_D$  estimé à 80  $\mu$ M et la solubilité du peptide, pour que la majorité des protéines FIV p24 en solution soit liée au substrat, la protéine FIV p24E A41C/T53C a été incubée avec le fragment peptidique à une concentration de 400  $\mu$ M soit environ  $5 \times K_D$ , permettant de saturer environ 80 % des protéines en ligand. Un lot de protéine FIV p24E A41C/T53C a ainsi été produit, et une partie a été directement incubée après purification et élimination de l'étiquette avec le peptide pour lancer la cristallogénèse. L'autre partie a été dialysée contre un tampon à forte salinité et à forte concentration de  $\beta$ -mercaptoéthanol puis contre un tampon sans agent réducteur et à basse salinité pour favoriser la formation

d'hexamères et de ponts disulfures préalablement à la co-cristallisation avec fCPSF6. Cela avait pour but de tester l'importance de la préformation des hexamères par la méthode de dialyse contre un tampon enrichi en agents réducteurs. Enfin, le lot de protéine ayant été dialysée est à une concentration de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  et la protéine non dialysée à  $7 \text{ mg.mL}^{-1}$ . L'objectif était de vérifier si des différences étaient observées à une concentration supérieure à la concentration critique de dimérisation de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013).

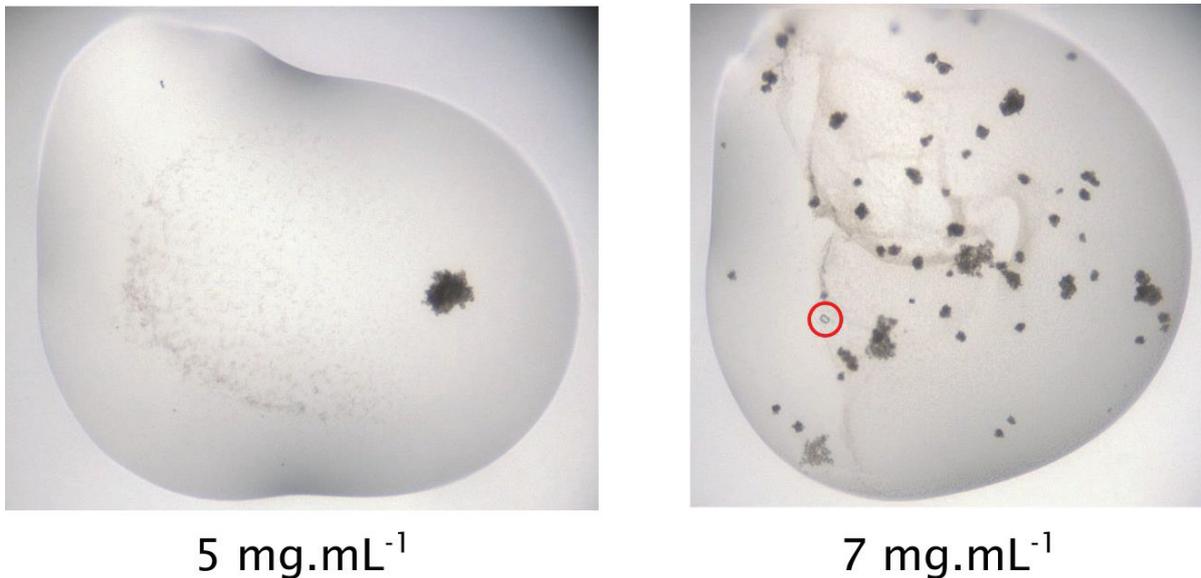


Figure 71 : Comparaison des évolutions de goutte de cristallisation entre un échantillon de protéine à 5 et à  $7 \text{ mg.mL}^{-1}$ . La concentration de protéine p24E A41C/T53C utilisée pour préparer les gouttes est indiquée en bas de chaque goutte. Le cercle sur la goutte de cristallisation à  $7 \text{ mg.mL}^{-1}$  indique la présence d'un cristal (taille estimée à  $20 \mu\text{m}$ ).

Plusieurs kits de cristallogénèse ont été utilisés, en testant à la fois la protéine dialysée et la protéine non dialysée en présence du peptide fCPSF6 :

- Kit Crystal screen
- Kit MIDAS+
- Kit PEG ion
- Kit PEG II

La condition PEG II – H8 avec la protéine à  $7 \text{ mg.mL}^{-1}$  a donné deux cristaux (Figure 71), mais l'analyse du profil de diffraction a révélé qu'il s'agissait de cristaux de sels. À ce jour, aucune information structurale expérimentale sur le complexe FIV p24:fCPSF6 n'a pu être obtenue.

---

### III. Discussion

---

Le travail de cette thèse a permis d'identifier un composé prometteur, **696**, capable d'interférer avec l'assemblage et avec le désassemblage de la capsid du FIV et, par la première attribution RMN de FIV p24, de définir les mécanismes moléculaires de l'interaction entre FIV p24 et **696**. Enfin, l'identification du site de fixation du composé met en évidence des propriétés similaires avec des composés thérapeutiques ciblant la capsid du VIH-1. L'ensemble de ce travail représente le premier pas vers la mise au point d'un traitement spécifique au FIV.

#### A. Récapitulatif des constructions utilisées

Au cours de ce travail, j'ai utilisé de nombreuses constructions de la protéine p24, tronquée, entière, portant les mutations Cys ou portant l'étiquette de purification en position N-terminale.

La Figure 72 présente les résultats d'alignements de séquence des différentes constructions pour résumer l'ensemble des constructions protéiques ayant pu être exprimées.

p24ΔCPT_A13CA44C	TIQTVNGVPQYVCLDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSCNLTPTDMATLIMAAPG	60
p24E_A13CA44C	TIQTVNGVPQYVCLDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSCNLTPTDMATLIMAAPG	60
p24ΔCPT_A13CA44CC61S	TIQTVNGVPQYVCLDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSCNLTPTDMATLIMAAPG	60
p24ΔCPT_A41CT53C	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24E_A41CT53C	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24ΔCPT_A41CT53CC61S	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24_pET28	MIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24ΔCPT	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24E	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
p24ΔCPT_C61S	TIQTVNGVPQYVALDPKMVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLTPTDMATLIMAAPG	60
*****		
p24ΔCPT_A13CA44C	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24E_A13CA44C	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24ΔCPT_A13CA44CC61S	SAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24ΔCPT_A41CT53C	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24E_A41CT53C	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24ΔCPT_A41CT53CC61S	SAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24_pET28	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24ΔCPT	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24E	CAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
p24ΔCPT_C61S	SAADKEILDESLKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAAEIMGIGLTQEQQAEARFAPARMQ	120
*****		
p24ΔCPT_A13CA44C	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24E_A13CA44C	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24ΔCPT_A13CA44CC61S	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24ΔCPT_A41CT53C	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24E_A41CT53C	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24ΔCPT_A41CT53CC61S	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24_pET28	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24ΔCPT	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24E	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
p24ΔCPT_C61S	CRAWYLEALGKLAAIKAKSPRAVQLRQAKEDYSSFIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQS	180
*****		
p24ΔCPT_A13CA44C	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
p24E_A13CA44C	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEIGSPGYKMQL-----	222
p24ΔCPT_A13CA44CC61S	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
p24ΔCPT_A41CT53C	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
p24E_A41CT53C	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEIGSPGYKMQL-----	222
p24ΔCPT_A41CT53CC61S	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
p24_pET28	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEINSSSVDKLAAALEHHHHH	232
p24ΔCPT	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
p24E	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEIGSPGYKMQL-----	222
p24ΔCPT_C61S	LSIANANADCKKAMSHLKPESTLEEKLRAQCQEI-----	213
*****		

Figure 72 : Alignement de séquence des différentes constructions génétiques utilisées (Clustal Omega). L'alignement repère les acides aminés portant les mutations testées et repèrent également le changement de position de l'étiquette de purification de la construction p24 pETΔCPM (p24\_pET28). Les mutations ponctuelles sont mises en évidence en surlignage.

## B. Impossibilité de la modélisation de l'assemblage hexamérique

La structure atomique de la protéine FIV p24 et de son assemblage en hexamères est un élément de départ pour le développement de composés inhibiteurs. Aussi, la structure de FIV p24 résolue préalablement représentait une avancée en ce sens (Folio *et al.*, 2017). Les deux protéines ont une identité de séquence relativement faible de 30 %, mais les domaines N- et C- terminaux superposés séparément

présentent une forte homologie de structure avec un RMSD (*root mean square difference*) de moins de 1 Å pour les carbones C<sub>α</sub> (Folio *et al.*, 2017). Il serait très intéressant de modéliser l'hexamère de FIV p24 depuis cette structure dimérique en prenant comme empreinte l'hexamère de VIH-1 p24. Cependant, comme décrit dans la partie II.A.1 page 53, cette structure dimérique était artéfactuelle en raison d'un pont disulfure intermoléculaire entraînant une disposition tête-bêche des sous-unités. Ceci pose un problème pour obtenir un modèle fiable de l'hexamère de FIV p24 comme expliqué ci-après.

Ainsi, dans l'hexamère de VIH-1 p24 qui est formé de sous-unités orientées parallèlement, l'interaction du domaine C-terminal d'une sous-unité avec le domaine N-terminal de la sous-unité voisine contribue à la stabilité de l'oligomère (Pornillos, Ganser-Pornillos et Yeager, 2011).

D'autre part, la conformation de la boucle de FIV p24 qui est située entre les domaines N et C-terminaux, diffère complètement par rapport à celle de VIH-1 p24 (Figure 73). Cette boucle semble importante chez les lentivirus. Chez le VIH-1, l'impact de l'orientation de la boucle entre les domaines N et C-terminaux a également été caractérisée par des expériences de mutagenèse sur cette boucle (Koma *et al.*, 2019). Les auteurs ont réalisé des mutations ponctuelles de chaque acide aminé contre une alanine, ou contre un acide aminé hydrophile à radical plus encombrant (S146N, S149N, S149D et S149K). L'ensemble de ces mutations inhibe la multiplication virale et diminue l'infectivité des particules virales formées.

Par ailleurs, cette région présente une faible variabilité parmi les différentes souches analysées par les auteurs de cette étude, qui se concentraient sur les souches du groupe M, qui est le plus répandu (Koma *et al.*, 2019). Cette étude montre ainsi la conservation du motif SP et SI en position 146-147 et 149-150 respectivement, tandis que le résidu 148 présente une plus forte variabilité. L'étude fait le lien entre les mutations sur cette boucle et la perte de capacité de la protéine à multimériser à l'aide d'observation en microscopie à fluorescence de cellules exprimant les protéines Gag mutées et l'aide de modélisation moléculaire. La modélisation *in silico* des interactions protéine:protéine au sein de l'hexamère est également en accord avec la nécessité pour les domaines N- et C-terminaux d'adopter un positionnement spécifique l'un par rapport à l'autre pour stabiliser l'assemblage hexamérique (Zhu et Chen, 2015).

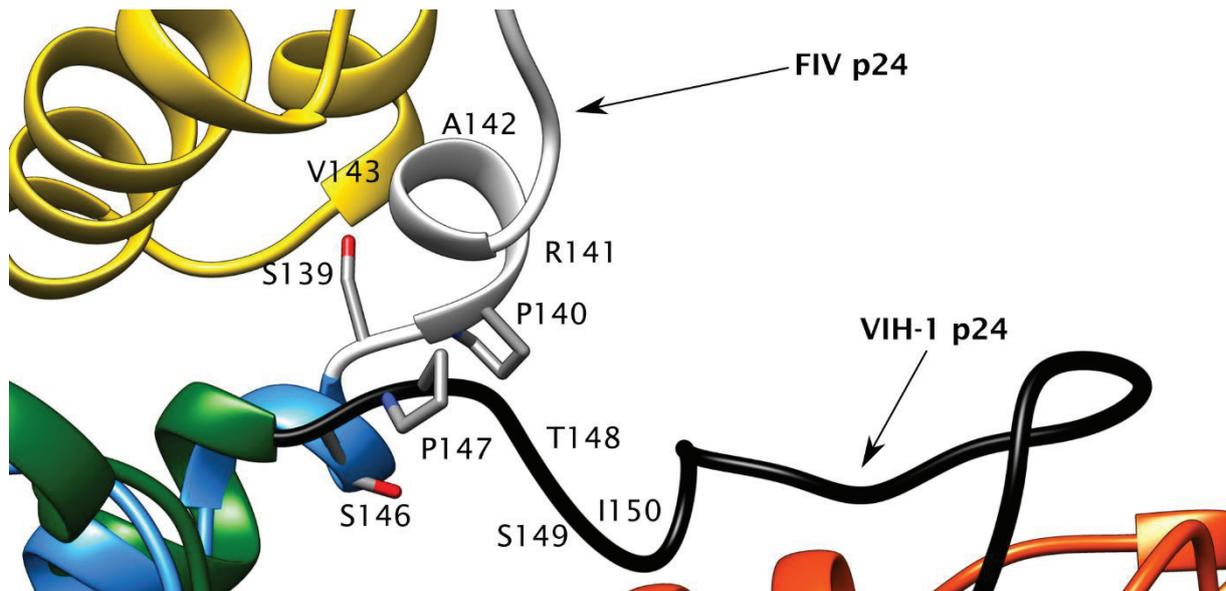


Figure 73 : Conservation du motif SP de la boucle flexible des protéines de capside du FIV et du VIH-1. Les couleurs correspondent à : VIH-1 p24, domaine N-terminal, boucle flexible, domaine C-terminal, en vert, noir et orange respectivement ; FIV p24 : domaine N-terminal, boucle flexible, domaine C-terminal en bleu, blanc, jaune respectivement. Les acides aminés de la boucle flexible de FIV p24 et VIH-1 p24 sont indiqués.

La conservation des séquences, du motif SP/X/SI en position 146-150 de la protéine VIH-1 p24, suggère que cette séquence est requise pour la conformation de la protéine à cet endroit. Or, on retrouve le motif SP dans FIV p24 en position 139-140, ce qui suggère que ce motif jouerait un rôle similaire dans la flexibilité de la boucle entre les domaines N et C-terminaux de FIV p24 (Figure 73). Cependant, le reste du motif SP/X/SI de VIH-1 p24 n'est pas retrouvé chez FIV p24. Cela limite la possibilité de modéliser la conformation de la boucle flexible de FIV p24 depuis la structure de l'hexamère de VIH-1 p24. En effet, les séquences de boucle sont conservées chez l'un et l'autre des virus VIH-1 et FIV, parmi leurs souches respectives circulantes ; or les deux séquences de FIV p24 et VIH-1 p24 diffèrent, et il est donc possible que les mécanismes de flexibilité soient différents.

La variabilité de la boucle de VIH-1 p24 a également été observée par RMN du solide au sein des hexamères de VIH-1 p24 (Bayro *et al.*, 2014 ; Lu *et al.*, 2020). Dans les tubules de VIH-1 p24 analysées, quatre conformations ont été observées, mais chacune permet des positionnements des domaines N- et C-terminaux similaires (Figure 74).

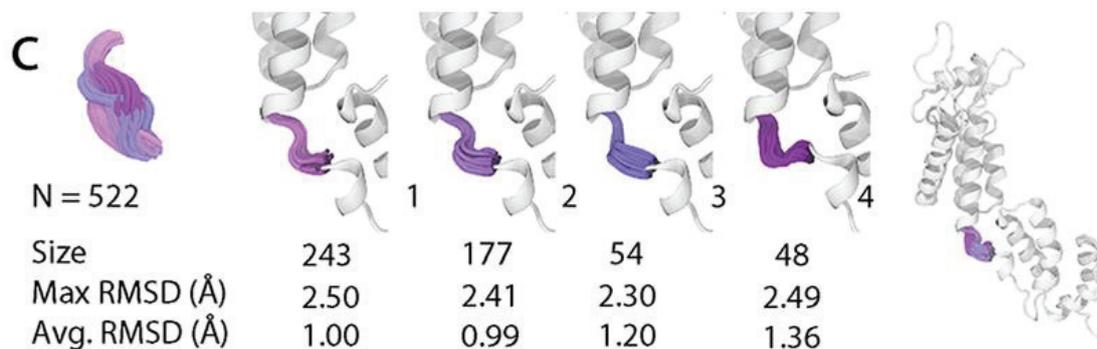


Figure 74 : Flexibilité de la boucle entre les domaines N et C-terminaux. Parmi l'ensemble des structures analysées (N=522), les quatre familles de conformations, numérotées de 1 à 4, représentent 47 %, 34 %, 10 % et 9 %. Pour chacune de ces familles de conformations, les coefficients de variabilité structurale (RMSD, root-mean square difference) sont présentés (d'après Lu *et al.*, 2020).

Ainsi, la flexibilité de la boucle entre le domaine N- et C-terminal est bien décrite chez le VIH-1. La conservation partielle des séquences entre le VIH-1 et le FIV pour cette boucle suggère que la boucle de FIV p24 présente une flexibilité similaire, mais le manque de conservation du reste de la séquence fait douter de la conservation du mécanisme de flexibilité, ce qui diminue la confiance en une modélisation de la structure hexamérique depuis l'hexamère de VIH-1 p24. En conséquence, des données expérimentales de l'hexamère sont nécessaires, soit des hexamères entiers, soit de la conformation adoptée par la boucle en son sein, ce qui permettrait alors de modéliser la structure.

### C. La protéine FIV p24 présente une dynamique intrinsèque

Le test d'assemblage en présence ou non de **696** montre que la présence du ligand induit un retard dans l'assemblage des particules (voir la partie II.B.2 page 93, Figure 54 page 93). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce comportement, dont la gêne stérique, une plus mauvaise accessibilité de l'interface d'assemblage ou un réajustement conformationnel induit par la fixation du composé sur la protéine.

Les données expérimentales de fixation obtenues par la RMN (voir la partie II.B.2.c) page 97) ont permis de délimiter la zone de fixation dans une zone définie par les hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$  de FIV p24. La modélisation de la fixation depuis ces données expérimentales propose une fixation proche de celle du composé PF74 et son dérivé GS-6207 sur VIH-1 p24. Ces deux composés agissent non pas en inhibant l'assemblage mais en stabilisant les hexamères (Peng *et al.*, 2014). Le composé **696** présente un encombrement similaire à PF74 et moindre que le dérivé GS-6207 (Figure 75). Aussi, l'hypothèse de l'inhibition par **696** de l'assemblage de FIV p24 par un encombrement stérique ou par une diminution de l'accessibilité de l'interface d'assemblage apparaît peu probable.

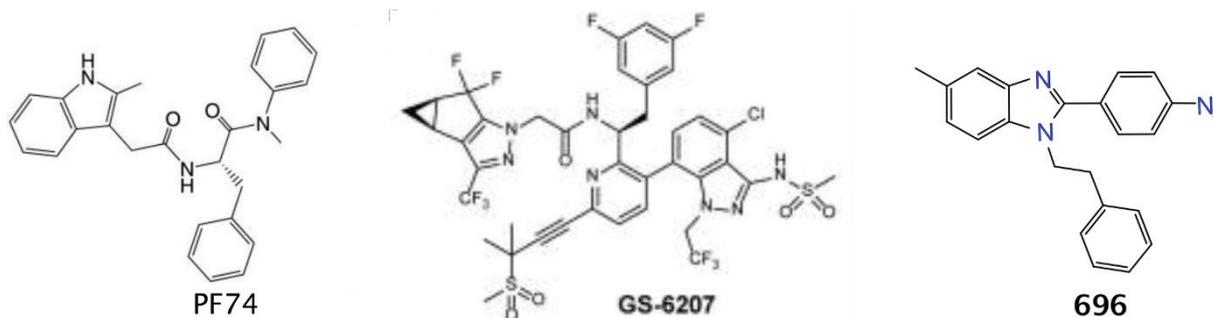


Figure 75 : Comparaison des molécules d'intérêt thérapeutique contre le VIH-1 (PF74 et GS-6207) et le composé **696** contre le FIV.

Nous pensons donc que l'explication au retard à l'assemblage de la capsid du FIV en présence de **696** provient d'un réarrangement structural induit par la fixation du ligand.

Cela est cohérent avec ce qui est observé en RMN. En absence de ligand déjà, les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC des échantillons  $^{15}\text{N}$ -p24 au cours du temps montrent une modification des déplacements chimiques de certains pics (voir la partie II.B.1.a) page 80, et Figure 45 page 83 et Figure 46 page 84).

Ce déplacement s'observe principalement entre le jour j0, le lendemain j1 et 7 jours après, j7, j0 marquant la décongélation de l'échantillon. Une partie des perturbations est observée entre j0 et j1. Elles correspondent à un réarrangement qui aurait lieu après la décongélation pour adopter la forme stable à température ambiante, *a fortiori* que ces changements se maintiennent à j7. En revanche, des perturbations supplémentaires ont été observées entre j1 et j7.

On ne peut exclure que cette évolution soit due simplement à une dégradation de la protéine, par une dénaturation partielle de la région en question par ou oxydation au cours du temps. Le signal ne semble pas diminuer en intensité au cours du temps, rendant l'hypothèse d'une dégradation de la protéine moins probable, mais il reste l'hypothèse d'une oxydation. En effet, dans ces premières conditions, le tampon utilisé était le plus simple possible, et ne contenait pas d'agents réducteurs. La cystéine 61 n'avait pas encore été identifiée comme particulièrement réactive pour la formation de ponts disulfures *via* la spectrométrie de masse, et nous n'avions pas ajouté de dithiothréitol comme pour les expériences RMN d'attribution qui ont suivi.

Il est difficile d'identifier les acides aminés qui ont des déplacements de pics entre j1 et j7 (Figure 46 page 84). Les pics ne se superposent pas à cause de la deutération et la région en encart de la figure peut correspondre aux radicaux de certains acides aminés portant des groupements N-H dans leur chaîne radicalaire. Il est difficile de conclure sur l'origine exacte de ces perturbations, mais elles pourraient provenir d'une capacité de la protéine à changer de conformation. La flexibilité de la protéine reste un point à étudier.

Par ailleurs, la boucle flexible correspond à une région partiellement mal attribuée en RMN (voir Figure 52 page 91). Les hélices  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  sont situées vers cette zone

flexible, l'hélice 7 juste avant et l'hélice 8 au sein de la zone flexible. Ces deux hélices présentent des lacunes dans leur attribution, correspondant à des acides aminés autres que proline et qui devraient donc être visibles dans nos expériences. Ces acides aminés ne sont cependant pas observés sur les spectres. Leur absence est parfaitement compatible avec la flexibilité de la boucle entre les domaines N- et C-terminaux.

Le test d'assemblage (voir la partie [II.B.2](#) page 93), qui a servi à mettre en évidence l'importance de la partie C-terminale de la protéine, soutient également cette flexibilité globale de FIV p24 (voir la partie [III.E](#) page 121). La protéine VIH-1 p24 a été étudiée par la RMN, aussi bien pour sa structure que pour sa dynamique. La détermination des constantes de relaxation, *via* des expériences à effet NOE, a mis en évidence une flexibilité au voisinage des hélices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$  (Okazaki *et al.*, 2014). La boucle entre les hélices  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$  et l'hélice  $\alpha_6$  sont indiquées par les auteurs de l'étude comme particulièrement flexibles et les auteurs considèrent la protéine comme présentant un caractère partiel de protéine intrinsèquement désordonnée (Okazaki *et al.*, 2014).

Enfin, les études structurales ont mis en évidence un processus de « *domain-swapping* », dû à la capacité du domaine C-terminal à échanger un de ses éléments structuraux, en l'occurrence une hélice  $\alpha$ , avec le même élément structural d'un autre monomère de protéine VIH-1 p24, par la RMN (Wong, Shin et Krishna, 2008) et par la cristallographie (Ivanov *et al.*, 2007). Cette capacité pourrait jouer un rôle dans la capacité de la protéine à s'oligomériser. Aussi, la protéine VIH-1 p24 est globalement structurée mais présente une capacité de réarrangements structuraux locaux.

Pour revenir à nos résultats, le recours à la perdeutération pour accroître la qualité du signal et le rapport signal/bruit reste incompris. La protéine p24  $\Delta$ CPT a une longueur de 213 acides aminés et un poids moléculaire de 24 kDa. Cette taille est compatible avec la RMN en solution sur un échantillon non deutéré (Kay et Gardner, 1997 ; Xu *et al.*, 2006). Cependant, les spectres acquis sur ces échantillons n'étaient pas d'une qualité suffisante pour permettre l'attribution. Malgré la perdeutération, la qualité du signal n'est pas uniforme sur l'ensemble de la protéine et la plupart des acides aminés autres que proline qui n'ont pas pu être attribués (26 sur les 33) sont situés dans le domaine N-terminal, dans la région impliquée dans la multimérisation. Ces acides aminés non attribués à cause du mauvais rapport signal/bruit sont localisés dans les hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$  principalement (voir la partie [II.B.1.d](#)) page 87).

Cela serait compatible avec une capacité de la protéine à s'oligomériser en solution pendant l'expérience RMN. Cependant, aucune dimérisation ni oligomérisation à un degré supérieur n'a été observée lors du test au BS<sup>3</sup>, réalisé à la concentration utilisée en RMN, depuis un aliquot de l'échantillon doublement marqué <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N utilisé pour l'acquisition des spectres 3D (voir la partie [II.B.1.b](#)) page 81). Aussi, si cette hypothèse est vérifiée, la dimérisation ne doit se réaliser qu'en faible proportion. D'ailleurs, la concentration utilisée, à 2,6 mg.mL<sup>-1</sup>, est

inférieure à la concentration critique de dimérisation de la protéine, déterminée à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013).

Une dimérisation, même en faible proportion, expliquerait donc la faiblesse du signal en RMN mais serait en désaccord avec le résultat du test de pontage covalent au BS<sup>3</sup>. L'autre hypothèse serait donc que le faible signal RMN provienne de la flexibilité de la protéine, notamment dans les régions à faible rapport signal/bruit, les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$ . Cependant, la boucle flexible entre les domaines N et C-terminaux a pu être attribuée, au contraire d'autres régions qui, sans être rigides, sont a priori moins flexibles comme l'hélice  $\alpha 7$ . De plus, les résultats de RMN sur la protéine VIH-1 n'avaient pas mis en évidence de flexibilité particulière sur cette hélice (Okazaki *et al.*, 2014). Il est possible que cette hélice 7 de FIV p24, faisant partie de l'interface de multimérisation, ait un comportement flexible inédit, mais qui reste encore inexpliqué.

En conséquence, bien que la perdeutération et l'ajout d'agents réducteurs aient augmenté l'intensité du signal, la nécessité de ces étapes reste énigmatique et nous ne pouvons que formuler l'hypothèse d'une forte versatilité de structure de la protéine.

Dans ce cas, la flexibilité de la protéine est potentiellement délétère pour la cristallisation, ce qui pourrait alors expliquer les échecs de cette approche. La formation du pont disulfure artéfactuel de la structure PDB 5NA2 correspondrait à une conformation rigidifiée par ce pont disulfure, limitant alors la flexibilité des protéines. Aussi, cela confirme la nécessité de stabiliser la protéine pour la formation des entités capsomériques (hexamères ou pentamères). Cette stabilisation apparaît donc comme nécessaire pour progresser dans la résolution de la structure, soit par la cristallographie aux rayons X, soit par la cryomicroscopie électronique, puisque l'hexamère a un poids théorique de 144 kDa, théoriquement suffisant pour les besoins de cette dernière technique.

#### D. Essais de stabilisation des hexamères de FIV p24 via les ponts disulfures

Les tests de cristallogenèse de l'hexamère sur la protéine native FIV p24 se sont révélés infructueux (voir la partie II.A.2 page 54). Cet échec apparaît logique considérant la flexibilité intrinsèque à la protéine évoquée précédemment. Cependant, la cristallisation des hexamères de la protéine p24 native du VIH-1 est possible comme le montrent les résultats de (Gres *et al.*, 2015) (PDB ID : 4XFX). C'est pourquoi nous avons tenté cette approche, dans un premier temps tout en prenant en compte la nécessité de diminuer la probabilité de formation du pont disulfure artéfactuel intermoléculaire sur la Cys 61 qui avait conduit à la résolution d'une structure cristalline dimérique tête-bêche de FIV p24 (voir la partie II.A.1 page 53).

En effet, la cristallisation du dimère de FIV p24 avec les ponts disulfures entre les cystéines 61 témoigne de la réactivité de cette cystéine pour la formation de ponts disulfures par rapport aux autres (Figure 25, page 54). Cette cystéine est dans une

boucle exposée au solvant et est donc très facilement accessible pour la formation de ces ponts.

La séquence de FIV p24 Petaluma sauvage que nous utilisons pour cette étude contient au total quatre cystéines, C61, C121, C190 et C210. Les deux dernières cystéines, Cys 190 et Cys 210 forment un pont disulfure intra-chaîne dans les conditions physiologiques (Nath et Peterson, 2001). Ces deux cystéines sont les homologues des Cys 198 et Cys 218 de VIH-1 p24, qui forment également un pont disulfure au sein du domaine C-terminal. En revanche, les deux autres ne sont pas décrites pour la formation de ponts dans les conditions physiologiques (Nath et Peterson, 2001).

Après analyse de l'hexamère de VIH-1 p24, les mutagenèses substituant le couple d'acides aminés A41 et T53 en cystéine ont été réalisées afin de stabiliser un hexamère de FIV p24 par ponts disulfures intermoléculaire. La spectrométrie de masse a cependant montré que les ponts disulfures formés impliquaient majoritairement la Cys 61 (Figure 37 page 72). Il est possible que cette construction ne soit pas la plus adéquate et qu'un autre couple d'acide aminé soit plus judicieux. La Cys 53 a pu établir des ponts disulfures, il serait donc possible de tester des mutants sur d'autres positions autour de Ala 41, comme l'acide aminé en position 40 ou 42 par exemple.

Deux autres cystéines de la protéine, C121 et C210, sont retrouvées par la spectrométrie de masse comme formant des ponts disulfures non attendus, dans une moindre proportion que C61. *A contrario*, le pont disulfure entre les deux cystéines 190 et 210 n'est pas retrouvé par la spectrométrie de masse. La formation de ce dernier est requise pour l'infectiosité du virus (Nath et Peterson, 2001). Aussi, son absence signifie que la protéine risque d'adopter une conformation incompatible avec la formation de la capsid virale.

La Cys 61 reste la plus réactive, ce qui s'explique par son exposition au solvant, tandis que la Cys 121 est située au sein de l'hélice  $\alpha 7$  et le radical de l'acide aminé semble peu accessible. D'un côté, le manque d'exposition de cette cystéine peut expliquer la moindre fréquence à laquelle elle a été retrouvée impliquée dans un pont disulfure par la spectrométrie de masse, de l'autre l'hélice  $\alpha 7$  a été identifiée comme flexible (voir la partie précédente III.C page 115), et donc la Cys 121 peut être au moins brièvement exposée au solvant et être engagée dans la formation d'un pont disulfure.

Cette formation de ponts disulfures pourrait expliquer la chute du signal 3D-RMN (voir la partie II.B.1.b) page 81). L'augmentation progressive de la taille de l'échantillon par cette dimérisation accroît la relaxation et fait chuter le signal. Les spectres acquis sur un échantillon de  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  p24  $\Delta\text{CPT}$  ne donnaient pas suffisamment de pics sur les spectres pour pouvoir attribuer les acides aminés, ce qui était particulièrement visible sur le spectre HNCACB (voir la Figure 47 page 85). La sensibilité a été augmentée par la perdeutération, mais sa nécessité reste à expliquer puisque la protéine monomérique fait 24 kDa, ce qui est compatible avec

les limites de sensibilité du spectromètre 900 MHz ayant servi à l'acquisition (Kay et Gardner, 1997 ; Xu *et al.*, 2006). Ce point a été mis en avant dans la partie III.C page 115. Puisque les résultats de spectrométrie de masse ayant identifié la réactivité de la Cys 61 sont venus de façon concomitante à l'optimisation de l'acquisition des spectres RMN, l'échantillon perdeutééré a été complété avec un agent réducteur, le dithiothréitol. Cet ajout a été fait pour optimiser l'échantillon avant l'acquisition du spectre, qui se fait sur plusieurs semaines. Cet échantillon a permis d'acquérir tous les spectres requis pour l'attribution RMN de la protéine (voir la partie II.B.1.d) page 87).

L'identification de sa forte capacité à former des ponts disulfures nous a menés à muter la Cys 61 en sérine. Cette mutation ne perturbe pas la capacité de la protéine à former des capsides virales (Nath et Peterson, 2001). La mutation C61S conserve l'encombrement et la polarité du résidu 61, tout en prévenant la formation de pont disulfure impliquant ce dernier (Nath et Peterson, 2001). Aussi, j'ai réalisé les constructions triple mutantes p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C/C61S (ATC) et p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C/C61S (AAC) (voir la partie II.A.4.b), page 73). Les mêmes mutations ont été réalisées sur la protéine entière, une fois que nous avons identifié que les derniers acides aminés sont impliqués dans la fixation du composé d'intérêt thérapeutique 696 sur la protéine (voir la partie II.B.2 page 93). On a donc également les constructions p24E C61S, p24E A41C/T53, p24E ATC, p24E A13C/A44C et p24E AAC.

Ces mutations sont susceptibles de perturber le repliement de la protéine. Cette possibilité est soutenue par les difficultés rencontrées lors de l'expression et de la purification de la protéine triple mutante p24E ATC (voir la partie II.B.4.c)(i) page 108). Les séquences du plasmide ont été vérifiées par le séquençage dans les deux sens de lecture, aussi bien du promoteur que le cadre ouvert de lecture. Pourtant, la protéine ne semble pas exprimée, ou sinon très peu, d'après les résultats de l'immunodétection sur membrane (voir Figure 70 page 109). La littérature montre qu'une protéine d'*Escherichia coli*, de poids moléculaire de 27 kDa, possède un domaine riche en histidine et il est possible que l'anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine se fixe sur cette protéine et génère le faible signal observé (Robichon *et al.*, 2011). Cela est compatible avec la faible intensité de signal et l'impossibilité de purifier la protéine p24E ATC.

Ces difficultés à exprimer la protéine restent encore sans explication, et sont peut-être liées à un simple problème technique dans le protocole d'expression. Cependant, l'expression a été testée selon trois protocoles différents, faisant varier la température d'induction de l'expression, la concentration de l'inducteur et le temps d'induction, sans succès. Il est difficile de conclure sur l'origine du problème, d'autant qu'*a contrario*, la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC et la protéine p24E A41C/T53C ont pu être exprimées et purifiées. Nous n'avons pas d'explications à cette différence de comportement entre ces deux protéines qui portent les mêmes mutations, sauf la délétion terminale de neuf acides aminés.

J'ai donc travaillé sur la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC pour vérifier si ces mutations pouvaient ou non perturber le repliement de la protéine, ce qui donnerait des informations à ce sujet. Le spectre de dichroïsme circulaire a été réalisé dans cet objectif (voir la partie II.A.4.c) page 77). La déconvolution du signal donne un résultat très similaire à la protéine p24  $\Delta$ CPT. Ces informations sont partielles puisqu'elles ne donnent que des informations sur le repliement global sans caractérisation précise de la conformation de la protéine. Cependant, cela serait en accord avec l'absence d'impact délétères des mutations sur le repliement de la protéine. Cela est intéressant pour la suite du projet quant à la stabilisation des hexamères par la formation des ponts disulfures, mais cela n'explique toujours pas les difficultés à exprimer la protéine p24E ATC.

La Cys 121 peut également être mutée en sérine sans que cela ne perturbe la formation de capsides (Nath et Peterson, 2001). Cette cystéine était également impliquée dans les ponts disulfures non désirés avec la Cys 53, dans une moindre mesure que la Cys 61 (voir Figure 37 page 72). Réaliser cette mutation supplémentaire pourrait contribuer, de la même façon, à éviter tout artéfact dû aux formations de ponts disulfures qui ne sont pas ceux désirés, et peut être envisagée si la mutation C61S ne suffit pas à favoriser la formation d'hexamères fonctionnels.

### E. La partie C-terminale de FIV p24 semble nécessaire à l'assemblage *in vitro*

Les essais de cristallisation de la protéine p24 avaient été réalisées sur la protéine tronquée des neuf derniers acides aminés qui avaient été prédits comme flexibles (Folio *et al.*, 2017). Aussi, nous nous sommes concentrés sur cette protéine pour l'ensemble des expériences de cristallogénèse, de RMN et d'interactions protéine:ligand.

Le test d'assemblage a cependant révélé des différences de comportements entre la protéine tronquée et la protéine entière (voir la partie II.B.2 page 93, Figure 54 et Figure 55 page 93 et page 94). L'assemblage montrait une différence de cinétique entre le contrôle et 696 avec la protéine entière p24E mais peu ou pas de différences avec la protéine p24  $\Delta$ CPT. Aussi, les deux protéines ont un comportement d'assemblage différent en présence du ligand. Afin d'évaluer si cette différence est liée à une modification de l'assemblage entre p24E et p24  $\Delta$ CPT ou d'une différence d'interaction de ces deux protéines avec le ligand, il serait intéressant de réaliser l'ensemble des expériences d'interaction avec la protéine entière, et de résoudre la structure de la protéine entière.

L'importance de la partie C-terminale chez VIH-1 p24 est par ailleurs mise en évidence par des résultats récents. La flexibilité de la partie C-terminale de VIH-1 p24 est de plus en plus décrite, ainsi que ses conséquences sur la dynamique de la protéine. Les constructions VIH-1 p24-SP1 (Gag 278-377) ou p24-SP1-p7 servent à étudier le comportement de la protéine avant clivage, au sein de la polyprotéine Gag (Dostálková *et al.*, 2020; Purdy *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2016). Les caractérisations de cette région par RMN du solide (Wang *et al.*, 2017), microscopie

électronique (Schur *et al.*, 2016) et cristallographie (Wagner *et al.*, 2016) montrent les différences structurales observées entre la forme mature et la forme immature de la protéine de capsid. Les observations en RMN du solide, couplées à l'étude de certaines mutations de cette extrémité C-terminale, montrent un équilibre en l'adoption d'une forme en hélice ou une région désordonnée (Wang *et al.*, 2017). En effet, au sein de la forme immature, la partie C-terminale de VIH-1 p24 adopte préférentiellement une forme en hélice (Schur *et al.*, 2016). Ces hélices sont stabilisées par l'interaction avec l'IP<sub>6</sub>, un polyanion qui stabilise les structures hexamériques en interagissant avec un anneau de lysine qui apparaît lorsque les protéines Gag s'autoassemblent (Dick, Zadrozny, *et al.*, 2018). Il est possible que l'assemblage en hexamère et la présence d'IP<sub>6</sub> déplace l'équilibre de la conformation du domaine CTD-SP1 vers un repliement en hélice. Bien que ces résultats aient été élucidés sur la région p24 CTD – SP1, ils mettent en évidence cette capacité de la partie C-terminale à alterner entre une forme désordonnée et une forme en hélice.

De façon intéressante, les mutations empêchant la fixation de l'IP<sub>6</sub> diminuent également la sensibilité aux inhibiteurs de la maturation, notamment le Bevirimat et le composé PF96, qui se lient dans cette région p24 CTD – SP1 (Ghimire *et al.*, 2017 ; Mallery *et al.*, 2021). Il est possible que le composé PF96 testé n'ait son site accessible que si l'IP<sub>6</sub> stabilise une conformation spécifique. Cela est en accord avec un modèle d'alternance des conformations de la protéine.

Cette variabilité de l'alternance des conformations pourrait expliquer les différences de résultats que j'ai observés lors des tests d'assemblage. L'assemblage se fait par la formation des hexamères et le réarrangement de la partie C-terminale peut être nécessaire pour stabiliser. Aussi, l'étape limitante du test avec la protéine tronquée p24  $\Delta$ CPT pourrait être la formation des hexamères davantage que l'interaction avec **696**. Comme l'affinité de **696** pour la protéine n'est pas extrêmement élevée, avec une constante de dissociation comprise entre 10 et 100  $\mu$ M, une part importante des protéines doit être dans l'état non lié au ligand. Il est possible que l'assemblage de p24  $\Delta$ CPT se fasse entre les protéines non liées au ligand, ce qui déplacerait au fur et à mesure l'équilibre vers la forme assemblée de la protéine et cela pourrait expliquer cette absence de différence de cinétique d'assemblage de p24  $\Delta$ CPT entre avec et sans **696** (Figure 55 page 94).

En conséquence, nos résultats expérimentaux d'assemblage (Figure 54 et Figure 55) et les données relatives à la capacité du domaine C-terminal à alterner entre conformation repliée ou désordonnée, nous ont amenés à travailler sur la protéine entière p24E. C'est aussi pour cela que la construction portant l'étiquette de purification en position C-terminale, p24-pET $\Delta$ CPM, qui avait permis une plus forte expression et amené à un protocole simplifié de purification (voir la partie II.A.2.b) page 56) est donc apparue peu pertinente au regard de cette nécessité et n'a pas été étudiée plus en avant.

## F. Les antiviraux ciblant VIH-1 p24 stabilisent les hexamères

La poche délimitée par les hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$ , de la protéine p24 VIH-1, dans laquelle se fixent les composés d'intérêt PF74 et GS-6207, lie de nombreux partenaires cellulaires (voir la partie I.G page 38). Elle interagit ainsi avec les nucléoporines Nup153 et Nup358 (Buffone *et al.*, 2018). Elle fixe également la protéine CPSF6 (Bhattacharya *et al.*, 2014 ; Fricke *et al.*, 2014).

Cette région est donc une cible thérapeutique fortement étudiée. Le composé PF74 a servi de molécule guide pour la mise au point de dérivés plus efficaces en sélectionnant les composés à la meilleure concentration efficace médiane ( $EC_{50}$ ) inhibant la réplication virale (Link *et al.*, 2020). Le composé GS-6207 contient le noyau PF74 avec des dérivés des groupements chimiques augmentant son efficacité inhibitrice (Link *et al.*, 2020). L'action de PF74 sur les infections par le VIH-1 requiert l'import nucléaire de la capsidie *via* les nucléoporines, notamment la nucléoporine Nup153 et la protéine CPSF6 (Link *et al.*, 2020 ; Saito *et al.*, 2016 ; Twizerimana *et al.*, 2020). Le composé PF74 inhibe l'entrée du génome dans le noyau (Link *et al.*, 2020). L'efficacité de cette molécule a été vérifiée sur le virus de l'immunodéficience simienne, en testant différents sous-types du virus (Twizerimana *et al.*, 2020). La production des virions SIV en cellules humaines, exprimant ou non certains partenaires protéiques comme les nucléoporines Nup153, Nup358 et CPSF6 a permis de mettre en évidence que l'action de ces composés dépend de la présence de nucléoporines. Le composé PF74 n'est cependant pas efficace contre le FIV (Thenin-Houssier et Valente, 2016).

Paradoxalement, le composé PF74 semble avoir deux modes d'action. À faible concentration (2  $\mu$ M), PF74 semble stabiliser les capsides virales (Peng *et al.*, 2014). À plus forte concentration (10  $\mu$ M et supérieure), le composé accélère la décapsidation et bloque la transcription inverse (Kleinpeter et Freed, 2020 ; Peng *et al.*, 2014 ; Saito *et al.*, 2016). La décapsidation déclenche la reconnaissance du génome viral dans le cytosol et active l'expression de gènes cellulaires stimulés par les interférons qui concourent à l'initiation d'une réponse antivirale innée et à une restriction antivirale cellulaire (Sumner *et al.*, 2020). Cette bimodalité de l'action reste contre-intuitive, mais des éléments permettent d'expliquer cette différence de comportement.

PF74 a une affinité plus importante pour les hexamères de VIH-1 p24 que pour les protéines monomériques (Bhattacharya *et al.*, 2014). Cette observation explique le comportement stabilisateur de la capsidie par déplacement de l'équilibre vers la forme assemblée. Cet effet est confirmé par des résultats de la microscopie à force atomique (Kleinpeter et Freed, 2020 ; Rankovic *et al.*, 2018). La microscopie à force atomique permet de tester la rigidité de la capsidie. L'exposition de la capsidie aux faibles concentrations de PF74 augmente cette rigidité, et diminue ainsi la probabilité d'initiation du désassemblage de la capsidie.

La rétrotranscription, qui se déroule à l'intérieur de la capsidie, impose un stress mécanique sur la capsidie (Rankovic *et al.*, 2018). Ces contraintes peuvent être mesurées à l'aide de la microscopie à force atomique. La présence du composé

PF74 maintient la stabilité de la capsid. Les désoxynucléotides (dNTP) peuvent diffuser dans la capsid en passant par un canal formé par les hexamères (Jacques *et al.*, 2016). Ce canal n'est pas en conformation ouverte de façon permanente et statique mais présente une dynamique d'ouverture et fermeture (Jacques *et al.*, 2016). La présence du composé PF74 stabilise la conformation ouverte et donc l'entrée des dNTP dans la capsid (Rankovic *et al.*, 2018). L'hypothèse proposée dans cette étude est que la rétrotranscription, facilitée par l'entrée des dNTP, augmente les contraintes mécaniques sur l'ensemble de la structure (Rankovic *et al.*, 2018). La capsid des lentivirus n'est pas symétrique et donc certains points locaux sont plus fragiles. Ces points locaux se dissocieraient, ce qui initierait le désassemblage de l'ensemble de la structure. Cela expliquerait l'effet déstabilisateur à haute concentration du composé.

De façon similaire, le composé GS-6207, dérivé de PF74, inhibe le cycle viral à une étape entre la transcription inverse et l'intégration (Link *et al.*, 2020). La caractérisation structurale de l'interaction entre GS-6207 et VIH-1 p24 montre que le composé stabilise le domaine C-terminal de la protéine et augmente la stabilité des hexamères (Bester *et al.*, 2020). Ce composé est plus affiné que le composé PF74 pour sa cible et perdure plus longtemps dans l'organisme que PF74, le rendant meilleur candidat pour l'utilisation comme traitement (Link *et al.*, 2020).

Ces hypothèses permettraient d'expliquer le double comportement contradictoire de PF74 selon s'il est utilisé à faible ou forte concentration (2  $\mu\text{M}$  ou supérieure à 10  $\mu\text{M}$ ). Une démonstration plus formelle à l'aide de données expérimentales reste nécessaire pour lever l'ambiguïté sur le comportement contre-intuitif de PF74.

### G. Mise en évidence du composé 696 ciblant la protéine de capsid du FIV

L'ensemble des travaux présentés a permis de caractériser la fixation de **696** sur la protéine monomérique, son site d'interaction et son affinité. L'étude par criblage de différents composés sur la cinétique de l'assemblage a permis une identification de plusieurs molécules interférant avec l'assemblage de la capsid (Sierra *et al.*, 2018). Le test permet de rapidement cribler un grand nombre de composés de la chimiothèque en utilisant des plaques 96 ou 384 puits. Cependant, l'assemblage de la protéine est déclenché par une forte augmentation de la salinité, avec l'ajout d'une solution de NaCl 1 M voire 2 M en volume équivalent au volume de solution protéique (voir la partie II.B.2.a) page 93). Cet ajout déclenche l'assemblage *in vitro* et permet le suivi par spectrophotométrie sur lecteur de plaques très aisément mais on ne peut exclure que la forte salinité perturbe les interactions protéine:ligand. Ce test doit donc être complété par d'autres expériences pour valider l'interaction. Il est possible qu'il ne permette pas de détecter des ligands qui se seraient fixés dans un tampon à salinité plus proche des conditions physiologiques.

Les composés identifiés ont été analysés ensuite par thermophorèse pour valider leur fixation et estimer les affinités de ces composés pour la protéine FIV p24. Parmi

l'ensemble des composés, les affinités sont variables, avec des constantes de dissociation  $K_D$  variant entre 10  $\mu\text{M}$  et 1 mM ou plus (voir Figure 58 page 97) (Long *et al.*, 2021 ; Sierra *et al.*, 2018). Les composés montrant des affinités de l'ordre de grandeur de 1 mM n'ont pas été retenus et nous avons sélectionné le composé **696** comme composé tête-de-liste pour la suite des expériences.

Cependant, l'étude du composé **696** est limitée par sa mauvaise solubilité dans l'eau. Le composé PF74, qui nous a servi de référence pour VIH-1 se liant à VIH-1 p24 sur le site homologue à celui que nous avons identifié pour **696** sur FIV p24, présente une solubilité variable selon le pH mais de l'ordre de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . La concentration d'inhibition  $\text{IC}_{50}$  de PF74 sur la multiplication du VIH-1 en culture est de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et l'affinité pour l'hexamère de VIH-1 p24 présente un  $K_D$  d'entre 100 et 200 nM (Jiang *et al.*, 2019 ; Price *et al.*, 2014). Aussi, même si le composé PF74 a une mauvaise solubilité dans l'eau, sa forte affinité pour sa cible permet de saturer les hexamères de VIH-1 p24 à sa limite de solubilité.

L'affinité de PF74 est meilleure pour l'hexamère de VIH-1 p24 que pour la protéine sous forme monomérique, avec des  $K_D$  respectifs de l'ordre de grandeur de 100 nM et 3  $\mu\text{M}$  (Price *et al.*, 2014). L'affinité mesurée de **696** pour FIV p24 sous forme de monomère est estimée vers 10  $\mu\text{M}$  avec la correction des valeurs dues à la mauvaise solubilité du ligand (voir la partie II.B.2.b) page 94) et par les ordres de grandeur de l'enthalpie libre de fixation de **696** estimée par le *docking* (voir la partie II.B.2.d) page 101). Aussi, notre composé **696** semble avoir une affinité pour un monomère de FIV p24 du même ordre de grandeur que PF74 pour un monomère de VIH-1 p24. Il est cependant difficile de comparer plus précisément les affinités de ces deux composés tant que nous n'avons pas d'hexamères de FIV p24 stables contre lesquels nous testerions alors le composé **696**.

Dans le cas du composé **696**, sa mauvaise solubilité a limité certains aspects de notre étude. Nous avons eu des soucis de sensibilité lors des expériences RMN (voir la partie II.B.2.c) page 97) et des points aberrants en ITC (voir la Figure 57 page 96). Lors des expériences RMN, il n'y a pas de différences entre les spectres acquis à une concentration de 200  $\mu\text{M}$  et à 400  $\mu\text{M}$  de **696** (Figure 62 page 100). Or, si l'affinité est voisine de 100  $\mu\text{M}$ , alors le passage de 200  $\mu\text{M}$  à 400  $\mu\text{M}$  devrait augmenter la fraction de protéine liée à **696** et des différences de pics devraient apparaître, ce qui n'est pas le cas. Les expériences de *Saturation Transfer Difference* (STD) montraient également un signal des protons de **696** fortement bruité, qui n'est pas compatible avec un signal enregistré sur un spectromètre à 900 MHz d'un ligand à une concentration théorique de 200  $\mu\text{M}$  (voir Figure 64 page 103).

Considérant les résultats obtenus en RMN et les problèmes de points aberrants lors de l'utilisation de l'ITC, il est très probable que la limite de solubilité de **696** soit en deçà de 200  $\mu\text{M}$ . Aussi, la concentration effective en solution serait inférieure à celle de 200  $\mu\text{M}$  attendue. Cela expliquerait les difficultés techniques rencontrées lors de l'utilisation de l'ITC, où la sonde était obstruée après chaque expérience d'injection, vraisemblablement par des particules de **696** restant en suspension. Ceci pourrait expliquer les points aberrants rencontrés dans la totalité des

expériences ITC. Pour terminer, la limite de solubilité en deçà de 200  $\mu\text{M}$  expliquerait les résultats des expériences de STD et pourrait amener à une mauvaise estimation du  $K_D$  par la thermophorèse. Le composé **696** reste très encourageant puisqu'il se fixe sur la même région de FIV p24 que PF74 sur VIH-1 p24 et que son affinité pour un monomère de FIV p24 est du même ordre de grandeur que PF74 pour un monomère de VIH-1 p24.

En absence de composé identifié ciblant la protéine de capsid du FIV (Fricke *et al.*, 2014), il est impossible de comparer avec une molécule de référence pour aider à identifier les molécules interagissant avec la protéine. D'autres molécules candidates dérivées de **696** sont en cours de développement. De plus, d'autres composés pourraient être identifiées par les expériences de criblage à venir. Ces molécules pourront être testées et comparées avec le composé **696**, qui représente notre référence *in vitro* jusqu'à l'identification d'une nouvelle molécule encore plus prometteuse.

La caractérisation du site de fixation du composé révèle l'intérêt de **696**, notamment lorsqu'on le confronte aux données publiées sur la capsid du VIH-1. Le site de fixation de PF74 sur VIH-1 p24 a été caractérisé en détail (Price *et al.*, 2014). Comme le composé PF74 a une faible durée de vie dans l'organisme, des dérivés à plus longue durée ont été testés (Link *et al.*, 2020). Le composé GS-6207, dérivé de PF74 le plus prometteur à ce jour, est en cours d'essai clinique contre le VIH-1 (Flexner *et al.*, 2021 ; Link *et al.*, 2020). Ce composé cible la région homologue de VIH-1 p24 de celle que j'ai identifiée pour la fixation de **696** sur FIV p24. Le composé GS-6207 stabilise la capsid, comme cela est montré sur les tests de cinétique de désassemblage où les particules de capsid perdurent dans le tampon de désassemblage lorsqu'elles ont été formées en présence du composé (Bester *et al.*, 2020). Ce test est d'ailleurs celui qui a inspiré notre expérience de désassemblage de la capsid du FIV, une fois que le *docking* moléculaire a identifié que la zone de fixation de **696** sur FIV p24 était la même que GS-6207 et PF74 sur VIH-1 p24 (voir la partie [II.B.3.b](#)) page 104, Figure 66 page 105).

Le test de désassemblage que nous avons réalisé sur FIV p24 en présence de **696** est prometteur, même si ses résultats sont moins marqués que le test originel de GS-6207 et VIH-1 p24 (Bester *et al.*, 2020). Dans ce dernier, le désassemblage des capsides de VIH-1 p24 non traitées à GS-6207 est rapide et l'intensité est nulle dès 1h après le début du désassemblage (Bester *et al.*, 2020). L'intensité du signal de VIH-1 p24 pour les particules formées avec GS-6207 reste constante au cours du temps, jusqu'à au moins 96h après le début du test. Dans notre essai, le désassemblage de FIV p24 n'est pas aussi rapide mais requiert au moins 24h alors que dans le même ordre de grandeur de temps, l'intensité des particules formées en présence de **696** diminue et reste légèrement visible après 32h.

## H. Hypothèse d'un mécanisme d'inhibition commun aux lentivirus

Le composé **696** se fixe dans une poche de FIV p24 équivalente à celle de PF74 et son dérivé GS-6207 sur VIH-1 p24 (voir la partie [I.I](#) page 43). La zone, délimitée par les hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$ , est également la zone de fixation des nucléoporines Nup153 et des protéines CPSF6 sur la capsid du VIH-1. Ces protéines sont requises pour l'import nucléaire de la capsid ou de l'ADN viral, selon si la décapsidation a lieu à l'intérieur du noyau ou non (voir la partie [I.H](#) page 41) (Scoca et Di Nunzio, 2021).

La fixation de PF74 et GS-6207 sur VIH-1 p24 entre en compétition avec la fixation de ces partenaires cellulaires (Bester *et al.*, 2020). Cette compétition entre ces composés thérapeutiques et les nucléoporines participe à l'action antivirale des composés, en plus des effets directs sur la stabilisation ou la déstabilisation de la capsid décrits précédemment (voir la partie [III.F](#) page 123).

Or, cette région de fixation des nucléoporines semble particulièrement importante pour la réalisation du cycle viral. En effet, les études récentes montrent l'importance de la capsid dans le transport du matériel génétique, la rétrotranscription et l'import nucléaire du génome viral (voir la partie [I.C](#) page 38) (Di Nunzio *et al.*, 2012 ; Lelek *et al.*, 2015 ; Novikova *et al.*, 2019 ; Zhou *et al.*, 2011).

Aussi, cette poche délimitée par les hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$  semble une cible thérapeutique de grand intérêt. L'importance cruciale des interactions de la capsid avec des partenaires cellulaires renforce la pertinence des composés PF74 et GS-6207 comme molécules candidates pour la mise au point de nouveaux traitements. D'ailleurs, à ce jour, aucune mutation conférant une résistance au composé GS-6207 n'a encore été observée (Marcelin *et al.*, 2020 ; Margot *et al.*, 2021). Ce manque de degré de variabilité de cette région est en accord avec le rôle crucial de cette poche dans l'import nucléaire du génome viral du VIH-1.

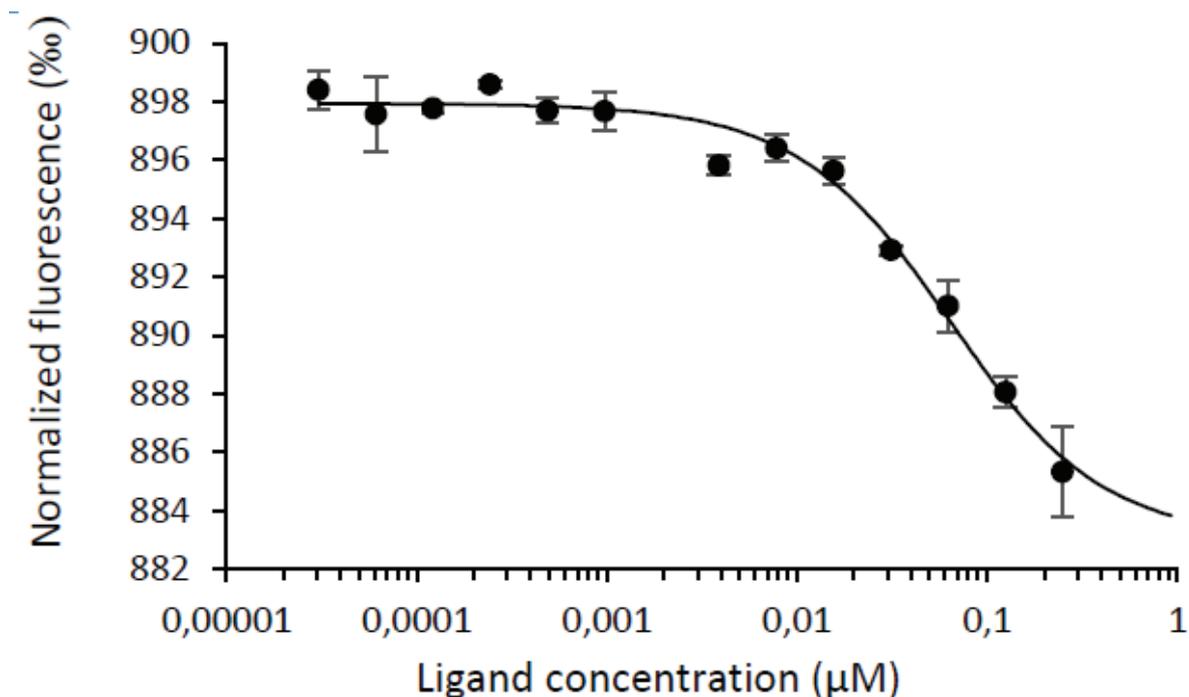


Figure 76 : Mesure d'interaction entre VIH-1 p24 et le composé **696** en thermophorèse. D'après Alvarez *et al.*, article soumis.

Notre composé **696** se fixe sur la zone homologue chez la protéine FIV p24, la poche délimitée par les hélices 3,4 et 7 (voir les parties II.B.2.c) et II.B.2.d) pages 97 et 101). Dans un article où je suis co-auteur, nous avons montré que le composé **696** se fixe également sur VIH-1 p24 ((Alvarez *et al.*, soumis), et Figure 76). La constante de dissociation estimée par la thermophorèse est d'environ 70 µM, ce qui est du même ordre de grandeur que l'interaction entre FIV p24 et **696** mesurée par thermophorèse (voir la partie II.B.2.b) page 94). De plus, le *docking* moléculaire suggère également une fixation dans la poche formée par les hélices 3, 4 et 7 de p24 VIH-1 (Alvarez et al, soumis).

Le composé **696** interagit à la fois avec la protéine FIV p24 et avec la protéine VIH-1 p24. Les affinités semblent du même ordre de grandeur. La zone de fixation de **696** sur FIV p24 a été déterminé par la RMN comme étant la région homologue du site de fixation des composés PF74 se GS-6207 sur VIH-1 p24. La zone de fixation de GS-6207 sur VIH-1 p24 semble avoir peu de degré de variabilité et aucune mutation d'échappement à GS-6207 n'a été identifiée chez les patients traités (Marcelin *et al.*, 2020 ; Margot *et al.*, 2021). Ce faible degré de variabilité laisse penser que cette zone d'interaction est nécessaire à l'infectiosité du VIH-1.

Les deux protéines FIV p24 et VIH-1 p24 partagent une homologie de structure malgré 30 % d'identité de séquence (voir I.F page 33). Les trois hélices  $\alpha$  sont retrouvées sur les deux protéines (voir Figure 16 B page 18). Les deux hélices  $\alpha_3$  de chacune des protéines possèdent 2 acides aminés identiques et 4 acides aminés homologues sur 9, les hélices 4 ont 7 acides aminés identiques et 4 homologues sur

21 et les deux hélices 7, 4 acides aminés identiques et 6 acides aminés homologues sur 22.

De façon surprenante cependant, les acides aminés identifiés par le docking comme impliqués dans l'interaction avec **696**, ne sont pas conservés (voir Figure 63 page 101). Parmi les acides aminés identifiés par le docking, seule la Leu 68 est conservée entre VIH-1 p24 et FIV p24 (Figure 16 page 37). Certains acides aminés sont homologues entre les deux chaînes (FIV Ile 55 et VIH-1 Leu 56 par exemple) mais la plupart ne sont pas conservés. Il est donc possible que l'optimisation de **696** amène à des composés, soit spécifiques du VIH-1, soit spécifique de FIV, mais probablement pas des deux protéines. Cela rejoindrait le constat de l'absence d'effets de GS-6207 sur FIV p24, probablement dû à l'optimisation de GS-6207 pour VIH-1 p24 par rapport aux groupements chimiques compatibles avec les chaînes latérales de VIH-1 p24 mais peu compatibles avec FIV p24.

Même si elle varie entre le FIV et le VIH, la zone de fixation des nucléoporines, ciblée par les composés PF74 et ses dérivés, est fortement conservée parmi l'ensemble des souches circulantes pour chaque virus. Le repliement des hélices est conservé entre FIV p24 et VIH-1 p24 (voir la partie I.F page 33). Le composé **696** se fixe sur ces deux protéines. Le composé **696** stabilise l'assemblage des capsides de FIV comme GS-6207 stabilise les capsides de VIH-1 (voir la partie II.B.3 page 103) (Bester *et al.*, 2020). Ainsi, en raison de ces analogies et du fait que le mécanisme cellulaire de l'inhibition de la réplication du VIH-1 par GS-6207 a été clairement identifié comme lié au rôle de cette poche dans l'import nucléaire de la capsid du VIH-1, nous pensons donc que la poche délimitée par les hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$  est indispensable à l'infectiosité des lentivirus. Cette poche représente donc une cible thérapeutique de grand intérêt, si ce n'est pour l'ensemble des lentivirus, au moins pour le FIV et le VIH-1.

Nous pensons également que la protéine de capsid du FIV pourrait jouer un rôle similaire à celle du VIH-1 pour l'interaction avec les partenaires cellulaires, et que la protéine FIV p24 pourrait interagir avec les nucléoporines des cellules des espèces félines infectées. Cela permettrait la réalisation des étapes similaires pour la progression du cycle viral, notamment l'entrée du matériel génétique dans le noyau. Les interactions entre nucléoporines et capsides lentivirales permettent l'entrée du matériel génétique dans des cellules quiescentes, au moins pour le VIH-1 (Buffone *et al.*, 2018) et de la même façon, une telle interaction permettrait d'expliquer la capacité du FIV à réaliser des infections productives dans des cellules qui ne se divisent pas.

### I. Ciblage de l'interaction avec les partenaires cellulaires

Cette hypothèse de mécanismes communs entre les lentivirus nous a amené à étudier les interactions entre la protéine de capsid du FIV et les nucléoporines félines. À nouveau, la description des mécanismes chez le VIH-1 et les nucléoporines humaines sert de modèle.

La nucléoporine 358 semble interagir avec VIH-1 p24 au niveau de la boucle riche en proline (Lin *et al.*, 2013). La protéine CypA et le domaine C-terminal de Nup358 ont une similarité de séquence de 75 % (entrées Uniprot P62937 et P49792) et leurs structures se superposent, avec un RMSD de 0,4 Å pour 130 C $\alpha$  (Figure 77) (Lin *et al.*, 2013). Cette nucléoporine n'interagit donc pas avec la protéine VIH-1 p24 au niveau du site d'interaction de PF74 sur la protéine VIH-1 p24. Aussi, nous nous sommes concentrés sur les autres protéines dont le site d'interaction a été déterminé comme étant le même que PF74, à savoir Nup153 et CPSF6 (Price *et al.*, 2014).

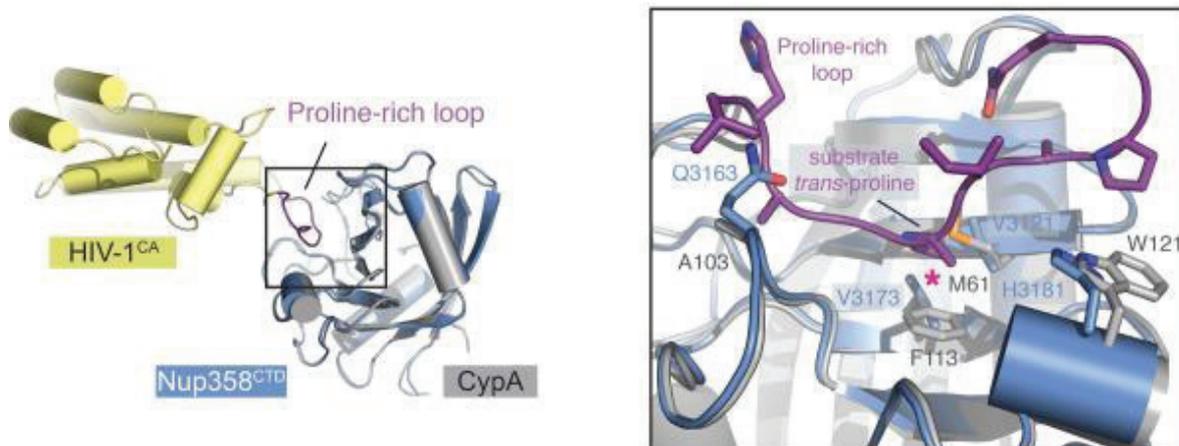


Figure 77 : Modélisation de l'interaction VIH-1 p24 – domaine C-terminal de Nup358. La structure du domaine C-terminal de Nup358 a été superposée sur la cyclophiline dans un modèle structural d'interaction VIH-1 p24:CypA (entrée PDB 1M9C). D'après (Lin *et al.*, 2013).

Nous avons identifié les fragments peptidiques des protéines Nup153 et CPSF6 félines homologues aux fragments peptidiques des protéines CPSF6 et Nup153 humaines utilisés en co-cristallisation avec VIH-1 p24 (voir la partie II.B.4.a) page 105) (Price *et al.*, 2014). Ces deux fragments peptidiques ont une interaction avec la protéine FIV p24, ce qui a été montré par la thermophorèse (voir la partie II.B.4.b) page 106). Cependant, il a été décrit que la protéine Nup153 ne semble pas être nécessaire à l'import de FIV dans le noyau de la cellule (Lee *et al.*, 2010). Cela ne remet pas nécessairement en question nos résultats de thermophorèse entre FIV p24 et les fragments de Nup153 féline. En effet, les interactions entre VIH-1 p24 et Nup153 se font principalement *via* les motifs FG (phénylalanine-glycine) (Buffone *et al.*, 2018 ; Matreyek *et al.*, 2013), qui sont caractéristiques des nucléoporines et environ un tiers des nucléoporines identifiées chez les Eucaryotes portent cette répétition (Terry et Went, 2009). Cette répétition du motif FG crée des boucles non repliées au sein de la protéine. Ces boucles sont exposées au centre du pore nucléaire et l'ensemble des motifs FG des nucléoporines forme un réseau de filaments fortement hydrophobes qui s'oppose à la libre diffusion des molécules biologiques de poids moléculaire supérieur à 30 ou 40 kDa (Frey, Richter et Görlich, 2006). Les protéines de transport nucléaire, par exemple les protéines de la famille Ran, peuvent lier les molécules biologiques cibles et s'introduire dans le pore nucléaire en déplaçant les motifs FG

(Terry et Wente, 2009 ; Wagner *et al.*, 2015). Ainsi, seules les protéines et complexes riboprotéiques reconnus par les transporteurs nucléaires peuvent franchir les pores nucléaires.

D'autres nucléoporines à motif FG participent également à l'import de la capsid du VIH-1 dans le noyau, même si aucune interaction directe n'a été identifiée (Zhuang et Torbett, 2021). Les nucléoporines identifiées comme telles, les nucléoporines Nup50, Nup62, Nup85, Nup98, Nup107, Nup133, Nup155, Nup160 et Nup214, partagent un tel motif FG. Il est possible que l'interaction entre VIH-1 p24 et ces dernières proviennent du domaine à motif FG répété et que les autres domaines de ces nucléoporines modulent l'affinité de ces protéines pour VIH-1 p24. Les motifs FG de Nup153 sont requis pour l'interaction entre Nup153 et VIH-1 p24 (Matreyek *et al.*, 2013). Les peptides de Nup153 et CPSF6, dont l'interaction avec VIH-1 p24 a été résolue par cristallographie, contiennent aussi ce motif FG répété (Gres *et al.*, 2015).

Pour en revenir à FIV, il a été décrit que le cycle viral de FIV n'est pas impacté par une perte d'expression de la protéine Nup153 et que la protéine Nup153 humaine n'interagit pas avec FIV p24 (Lee *et al.*, 2010 ; Matreyek *et al.*, 2013). Ces résultats ne semblent pas compatibles avec nos résultats expérimentaux de thermophorèse. Cependant, il s'agissait de tests *in cellulo* et non de tests d'interactions directes entre les deux protéines tels que nous les avons menés, et il est possible qu'une autre nucléoporine contenant le motif FG puisse remplacer fNup153 lors de l'infection. De plus, nous avons utilisé un fragment de la nucléoporine féline alors que le test fonctionnel étudiait le rôle de la protéine Nup153 humaine (Lee *et al.*, 2010). Il est possible que des différences structurales entre les nucléoporines humaines et félines créent des gênes stériques qui diminuent l'affinité de FIV p24 pour la nucléoporine Nup153 humaine. On ne peut pas conclure sur l'existence ou l'absence d'interaction entre Nup153 féline et FIV p24 avec ces données bibliographiques.

Les fragments peptidiques de fNup153 et fCPSF6 que nous avons utilisés contiennent le motif FG répété (voir la partie II.B.4.b) page 106). Or, pour le VIH-1, ce motif FG est impliqué dans l'interaction entre VIH-1 p24 et les nucléoporines. Nous pensons donc que pour la protéine FIV p24, c'est également le motif FG des fragments peptidiques testés qui permet l'interaction avec la protéine de capsid du FIV. Si cette hypothèse est correcte, l'étude du fragment fNup153 fournirait donc un modèle d'étude des interactions entre FIV p24 et les nucléoporines effectivement impliquées dans l'import nucléaire du FIV.

En résumé, notre hypothèse du mécanisme commun entre FIV p24 et VIH-1 p24 quant au rôle des hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_7$  nous a amené à étudier le rôle des nucléoporines dans l'interaction avec la protéine de capsid du FIV. Les données de la littérature scientifique et nos résultats d'interaction avec les fragments peptidiques des protéines Nup153 et CPSF6 félines nous amènent à penser que la protéine FIV p24 a une affinité pour les nucléoporines cellulaires par reconnaissance de leur motif FG. Cette interaction pourrait probablement se faire

via la même région que celle décrite pour le VIH-1 et délimitée par les hélices  $\alpha$  3,4 et 7.

Notre hypothèse suppose donc que les lentivirus sont dépendants de l'interaction entre leur protéine de capsid et les nucléoporines via la région délimitée par les hélices  $\alpha$ 3, 4 et 7, pour l'entrée dans le noyau. Ce qui nous empêche d'aller plus loin dans la caractérisation de ce mécanisme commun est que tous les lentivirus n'ont pas les mêmes dépendances aux mêmes partenaires cellulaires. En effet, l'interaction entre hNup153 et VIH-1 p24 est bien décrite, mais à notre connaissance, l'interaction entre FIV p24 et la protéine féline Nup153, en cellules félines, n'a, à notre connaissance, pas été testée. Il est possible qu'*in vivo*, une autre nucléoporine que Nup153 soit impliquée via une meilleure affinité pour FIV p24. L'identification de la nucléoporine effectivement impliquée dans l'import permettrait de mieux caractériser le rôle des motifs FG et la conservation des mécanismes d'interaction entre les protéines de capsid lentivirales et les nucléoporines pour l'import nucléaire de la capsid virale.

### J. Nécessité d'une optimisation de 696

La molécule **696** est une tête de série qui a été identifiée lors d'un criblage de plus de 400 molécules. Nos résultats montrent qu'il est nécessaire de l'optimiser pour la mise au point d'une molécule utilisable en thérapeutique. En effet, l'affinité de **696** pour FIV p24, mesurée entre 10 et 100  $\mu$ M selon les résultats obtenus (voir les parties II.B.2.b) page 94 et II.B.2.d) page 101) semble trop faible dans une visée pharmacologique même si l'on peut penser qu'elle est plus importante pour les hexamères. Par ailleurs, d'après nos résultats, la limite de solubilité de **696** serait inférieure à 200  $\mu$ M. Outre le fait que cela biaise nos résultats de mesure de  $K_D$ , cela pose aussi un problème par rapport au dosage éventuel de la molécule pour une utilisation *in vivo*.

Le composé **696** doit donc être considéré comme molécule guide pour la mise au point d'autres molécules à meilleure affinité et meilleure solubilité. L'objectif est de se servir du modèle de fixation obtenu par *docking* moléculaire (Figure 63 page 101) pour identifier les interactions et les groupements importants de la molécule. L'identification d'une molécule plus hydrosoluble permettrait de mesurer précisément l'affinité et serait plus compatible avec une utilisation en médecine vétérinaire.

Des dérivés synthétisables par nos collaborateurs seront criblés par modélisation informatique dans un premier temps. Cette étape permettra alors d'identifier, parmi l'intégralité des molécules similaires, de nouvelles têtes de liste pour recommencer les mêmes processus de tests. Cette approche itérative permettra d'isoler des molécules intéressantes pour des tests ultérieurs *in cellulo*.

## K. Affinement de la caractérisation de l'interaction de 696 avec la capsid du FIV

Aucun composé ciblant FIV p24 n'a été identifié à ce jour (Hosie *et al.*, 2017 ; Mohammadi et Bienzle, 2012 ; Sierra *et al.*, 2018). Le composé PF74, dont est dérivé GS-6207, et qui a servi de modèle pour l'étude des molécules ciblant la capsid du VIH-1, ne se fixe pas sur FIV p24 (Fricke *et al.*, 2014 ; Opp *et al.*, 2017). Aussi, la caractérisation de l'action de **696** s'est faite sans comparaison avec une référence fiable et **696** représente la première molécule de référence en vue d'un traitement médicamenteux ciblant la capsid du FIV.

Enfin, les études de l'interaction entre PF74 et ses dérivés et VIH-1 p24 ont été réalisées sur les hexamères de VIH-1 p24 (Balasubramaniam *et al.*, 2019 ; Rankovic *et al.*, 2018 ; Saito *et al.*, 2016 ; Twizerimana *et al.*, 2020). Les composés PF74 stabilisent les interactions entre les différentes sous-unités des hexamères. Cela peut contribuer à expliquer pourquoi l'affinité que nous mesurons sur un monomère en thermophorèse et ITC (voir la partie II.B.2.b) page 94) est assez faible, de l'ordre de 100  $\mu$ M. On peut imaginer que l'affinité de la molécule **696** sur un hexamère est plus importante puisque nos résultats suggèrent que **696** établit des interactions avec les autres sous-unités de l'hexamère. Cependant, la stabilisation des hexamères par les ponts disulfures n'a pas abouti pour l'instant.

Or, le test d'assemblage induit par la forte salinité à NaCl 1 M (voir la partie II.B.2 page 93) n'est pas adéquat pour les expériences de mesure d'affinité. La très haute salinité risque de perturber la fixation et de biaiser les résultats d'affinité. Par ailleurs, ce choc salin forme de grosses particules hétérogènes, visibles à l'œil nu, et donc sédimentant rapidement. Cette sédimentation est incompatible avec de nombreuses expériences de mesures d'affinité comme l'interférométrie lumineuse (BLItz), l'ITC ou la thermophorèse. Le test de désassemblage de la capsid (voir la partie II.B.3.b) page 104) montre par ailleurs que les particules resuspendues dans un tampon à basse salinité se dissocient rapidement et l'intensité des bandes décroît dès les premiers instants de la resuspension, entre 0 et 8 h après resuspension (Figure 66 page 105). Aussi, stabiliser les hexamères apparaît comme nécessaire pour la poursuite du projet. Les formations de ponts disulfures sur la protéine entière doivent encore être optimisées mais quand ils seront obtenus, les hexamères stabilisés seront utilisés pour relancer des expériences de mesure de l'affinité sur ce qui nous apparaît comme étant probablement la cible effective de **696**. De plus, stabiliser les hexamères permettrait de reproduire les expériences ayant réussi pour la caractérisation des hexamères de VIH-1 p24 par la RMN du solide (Lu *et al.*, 2020), la cryo-microscopie électronique (Bharat *et al.*, 2014) ou la cristallographie (Pornillos *et al.*, 2010). Ces informations structurales seront également très utiles pour guider l'optimisation de **696**.



## IV. Conclusion et perspectives

---

Ce travail a mis en évidence plusieurs propriétés de la protéine FIV p24. Il s'agit d'une première étape vers la mise au point d'un traitement efficace contre les infections au FIV. Nous avons réalisé l'attribution de la protéine en RMN. Cette attribution a permis la caractérisation de la fixation d'un ligand sur la protéine et pourra servir à aider à la caractérisation d'autres molécules fixant la protéine de capsid du FIV. Nos données suggèrent une forte flexibilité de la protéine, notamment au niveau de la boucle entre les domaines N- et C-terminaux ainsi que dans la partie C-terminale. Enfin, nos données ont mis en évidence un composé, **696**, d'intérêt thérapeutique qui stabilise la capsid du FIV.

La poursuite du projet requiert la stabilisation de la protéine FIV p24 sous forme hexamérique, quelle que soit la technique d'analyse structurale subséquente envisagée. L'interface de multimérisation est inconnue et ne peut pas être modélisée avec une bonne fiabilité en utilisant comme empreinte VIH-1 p24. Or, cette interface est nécessaire pour comprendre l'assemblage de la capsid. Cette interface est déjà une cible thérapeutique pour le VIH-1 et sa caractérisation dans FIV p24 faciliterait le développement rationnel de futurs composés thérapeutiques contre le FIV.

La purification des hexamères permettrait d'envisager leur cristallisation en évitant des oligomérisations artéfactuelles de FIV p24. Leur taille serait par ailleurs suffisante pour que les hexamères puissent être observés en cryo-microscopie électronique. Les deux techniques ont fait leur preuve pour la caractérisation de la fixation d'inhibiteurs, aussi bien pour la capsid du VIH-1 (Link *et al.*, 2020 ; Price *et al.*, 2014 ; Purdy *et al.*, 2018) que sur d'autres protéines du VIH-1 (Ozorowski *et al.*, 2020 ; Van Drie et Tong, 2020). Cela laisserait plusieurs approches possibles pour résoudre la structure des interfaces des hexamères de FIV p24.

Le composé **696** est un composé non optimisé. Il n'est pas suffisamment affin ni suffisamment soluble pour être utilisé comme agent thérapeutique mais il représente une molécule guide prometteuse, dont des dérivés pourront être testés afin d'identifier, par cycles d'affinements itératifs, des molécules plus efficaces. Par ailleurs, outre les problèmes liés à l'utilisation d'une molécule peu soluble comme traitement vétérinaire, l'identification de dérivés plus hydrosolubles de **696** est nécessaire pour caractériser plus finement les interactions en rendant possibles certaines expériences dont le signal est fortement bruité par la mauvaise solubilité. En particulier, les expériences de *Saturation Transfer Difference* pourraient identifier les <sup>1</sup>H du composé dont le signal est atténué par la liaison à la protéine (Di Carluccio *et al.*, 2021). Ces données expérimentales pourraient alors être confrontées aux expériences de *docking* moléculaire afin de définir l'interface d'interaction **696**:p24 au niveau du composé.

Le résultat de *docking* moléculaire, combinés aux résultats de *Chemical Shift Perturbation* des expériences RMN, ont permis d'identifier le site de fixation de **696**

sur FIV p24, délimité par trois hélices  $\alpha$ , les hélices 3,4 et 7. Le site homologue chez la protéine VIH-1 p24 est une excellente cible thérapeutique. En effet, le composé en cours d'essai clinique en phase II se lie à cette région de VIH-1 p24 et stabilise la capsid. Par ailleurs, ce même composé entre en compétition avec les nucléoporines cellulaires pour la fixation sur la protéine VIH-1 p24 et inhibe ainsi l'import nucléaire de la capsid du VIH-1.

De plus, le composé **696** se fixe également sur la protéine VIH-1 p24 et dans la même poche formée par les hélices 3,4 et 7. Aussi, nous avons formulé l'hypothèse d'un mécanisme commun des capsides des lentivirus pour la fixation des partenaires cellulaires se fixant sur la région délimitée par ces trois hélices. Cela nous a amené à étudier l'interaction entre FIV p24 et les nucléoporines félines. Nos résultats démontrent une interaction entre les nucléoporines félines et FIV p24. Le site de fixation peut être modélisé par homologie depuis les structures connues d'interaction entre les nucléoporines humaines et VIH-1 p24. Des données expérimentales restent nécessaires pour valider l'hypothèse.

Le modèle de l'import nucléaire de la capsid de FIV repose sur la transposition des connaissances et découvertes récentes quant à l'import nucléaire du VIH-1. Chez le VIH-1, l'import nucléaire de l'ADN double brin complexé avec l'intégrase virale, des sous-unités de VIH-1 p24, des facteurs de transcription ainsi qu'avec des nucléoporines et importines cellulaires est très bien caractérisé (Krishnan *et al.*, 2010). Il n'est pas encore clairement défini si la capsid entière ou seulement une partie est importée dans le noyau, mais les interactions avec les nucléoporines et les résultats d'observations de protéines de capsid marquées montrent un import au moins partiel de la capsid (Scoca et Di Nunzio, 2021). L'import de la capsid du FIV dans le noyau des cellules félines n'a pas été démontré. Cet import nucléaire apparaît cependant probable par comparaison avec les autres lentivirus, qui montrent l'importance du motif FG des nucléoporines dans l'interaction avec la protéine de capsid du VIH-1 et la protéine de capsid du FIV. Aussi, il est possible que les nucléoporines cellulaires impliquées dans les interactions ne soient pas les mêmes entre le VIH-1 et le FIV, mais que ce soit dans les deux cas des nucléoporines portant la répétition du motif FG. L'identification des nucléoporines effectivement impliquées dans l'import nucléaire de la capsid entière ou d'une partie de la capsid du FIV soutiendrait cette hypothèse du mécanisme commun. Notre hypothèse serait alors que **696** puisse entrer en compétition avec ces nucléoporines pour la fixation sur FIV p24. Aussi, la combinaison de la caractérisation des nucléoporines félines impliquées et de l'optimisation de **696** pourrait permettre de tester finement cette compétition de fixation, de façon similaire à ce qui a été fait entre PF74 et la fixation des partenaires cellulaires humains sur VIH-1 p24 (Bhattacharya *et al.*, 2014).

Par ailleurs, le composé **696** stabilise la capsid du FIV. Les composés PF74 et GS-6207 font de même pour la capsid du VIH-1 et ont une meilleure affinité pour les hexamères de VIH-1 p24. Puisque les deux composés ciblent la même région sur leurs protéines respectives, il est possible que **696** ait les mêmes propriétés. Les dérivés plus affins de **696** pourraient alors être utilisés en co-cristallisation pour

aider à stabiliser les hexamères de FIV p24 et *in fine*, résoudre la structure des hexamères. Ce rôle stabilisateur pourrait également être assuré par des fragments peptidiques de nucléoporines félines à affinité pour la protéine de capsid du FIV, à l'image de ce qui a été fait pour le VIH-1 (Fricke et Diaz-Griffero, 2016).

En conclusion, ce travail de thèse a mis en évidence un composé prometteur dans la mise au point d'un traitement anti FIV. Ce composé requiert une optimisation consistant en l'identification de molécules plus affines et plus hydrosolubles. Les expériences décrites dans ce travail peuvent être utilisées pour la mise en place du processus itératif d'amélioration du composé par tests de dérivés de la molécule guide retenue à l'issue de chaque cycle d'amélioration, jusqu'à l'identification d'un composé suffisamment affin. Les résultats obtenus, notamment de l'attribution RMN, aideront à la mise en place de ces tests. Nous avons aussi décrit une stratégie pour stabiliser la protéine de capsid du FIV à l'aide des ponts disulfures. Cette stratégie n'a, à ce jour, pas permis d'obtenir une information structurale des hexamères de la protéine de capsid du FIV. Un modèle atomique de l'hexamère reste nécessaire pour comprendre l'assemblage de la capsid et aider à la rationalisation du processus d'amélioration du composé **696** par modélisation moléculaire. Nous pensons que les constructions génétiques réalisées peuvent, *in fine*, aider à la stabilisation des hexamères et à leurs observations, en cryo-microscopie électronique ou en cristallographie. Enfin, le FIV avait été suggéré comme modèle d'étude du VIH-1 et aider à l'identification de molécules d'intérêt thérapeutique contre le VIH-1. Cette hypothèse avait été critiquée puisque les molécules actives contre le VIH-1 se sont révélées inefficaces contre le FIV. Notre composé, en revanche, montre une affinité pour la protéine de capsid du FIV et celle du VIH-1, avec une valeur du même ordre de grandeur. Cette propriété est étudiée en parallèle, car le site de fixation commun nous a amené à développer l'hypothèse d'un mécanisme partagé de fixation des nucléoporines sur les protéines de capsid des lentivirus. Nous espérons que l'optimisation de **696** pourra mener à des composés efficaces aussi bien contre le VIH-1 que le FIV. Un tel mécanisme commun, s'il a été conservé au long de l'évolution des lentivirus, représente sans nul doute une cible thérapeutique prometteuse qui mérite d'être explorée plus en détail, pour le FIV comme le VIH-1 voire d'autres infections lentivirales d'importance vétérinaire.



---

## V. Matériels et méthodes

---

### A. Clonage des gènes sauvages et mutants de FIV p24

#### 1. Transformation des bactéries

Les bactéries chimiquement compétentes sont préparées à partir de souches commerciales. La souche utilisée dépend de l'objectif de la transformation. Pour l'amplification d'ADN, les souches employées sont dérivées de la bactérie *Escherichia coli* : souche NEB 5 $\alpha$  de New England Biolabs (NEB), ou TOP10 de Thermo Fischer Scientific. Pour l'expression de protéines, nous utilisons les souches de la bactérie *E. coli* BL21, T7 Express ou SHuffle de NEB. Les bactéries sont transformées par choc thermique : un volume de préparation d'ADN (0,5  $\mu$ L pour un plasmide déjà amplifié, 5  $\mu$ L pour un produit de ligation) est mélangé à 50  $\mu$ L de suspension bactérienne de la souche choisie. Le mélange est incubé à 4°C sur glace pendant environ 45 min, puis les bactéries sont exposées à un choc thermique à 42°C pendant 45 s. La suspension bactérienne est ensuite complétée avec 300  $\mu$ L de milieu riche S.O.C. (tryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM, Thermo Fischer). La suspension est incubée avec agitation à 37°C pendant 45 min à 1 h. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de Pétri (la totalité de la suspension pour une transformation par un produit de ligation, 50  $\mu$ L si le plasmide de transformation est un plasmide déjà amplifié), contenant un milieu de culture solide LB agar Luria low salt (Sigma-Aldrich), complété avec l'antibiotique de sélection du plasmide : ampicilline 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> ou kanamycine 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (Euromedex). La boîte est incubée à 37°C sur la nuit et stockée le lendemain en chambre froide, au maximum jusqu'à deux semaines, pour utilisation par prélèvement des clones et mise en culture.

#### 2. Amplification d'ADN – minipréparation

Au cours de ce travail de thèse, j'ai utilisé les souches NEB-5 $\alpha$  pour amplifier de l'ADN depuis un plasmide purifié déjà amplifié au préalable, et les souches TOP10 pour amplifier les ADN obtenus par ligation pour le clonage ou le sous-clonage. Les transformations ont été réalisées selon le protocole préalablement décrit.

Pour chaque expérience, j'ai mis en culture quatre clones au moins par transformation (quatre pour les plasmides déjà purifiés et entre quatre et dix selon les rendements de transformation pour les produits de ligation). Les colonies prélevées depuis la boîte de Pétri sont mises en culture en bouillon de culture LB low salt (Sigma-Aldrich) complété avec l'antibiotique de sélection (ampicilline 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> final ou kanamycine 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> final) à 37°C sous agitation 350 rotations par minute (rpm) sur la nuit, dans un volume de 5 mL. Les bactéries sont ensuite sédimentées par centrifugation (11 000  $\times$  g, température ambiante, 2 min), le surnageant éliminé et l'ADN plasmidique est extrait du culot *via* le kit « NucleoSpin Plasmid, Mini » de Macherey-Nagel (MN), selon le protocole du fournisseur du kit. L'élution finale du plasmide depuis la résine est réalisée dans un volume de 50  $\mu$ L

de tampon d'élution du kit. Le dosage de la concentration en ADN a été réalisé par spectrophotométrie UV sur un NanoDrop (ThermoFischer).

Le plasmide obtenu a été contrôlé par digestion aux enzymes de restriction adéquates (toutes fournies par NEB). Une quantité d'entre 500 ng et 1 µg de plasmide est digérée dans un volume de 20 µL, dans le tampon Cutsmart 1X (NEB), par 1 UI de chaque enzyme, à 37°C pendant 1 h. L'analyse des tailles des fragments obtenus a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose.

### 3. Électrophorèse, révélation et analyse des fragments d'ADN

La séparation des fragments d'ADN est réalisée dans un gel d'agarose au pourcentage entre 1 et 2 % selon la taille des fragments attendus, en tampon TAE 1X (Euromedex) et complété au bromure d'éthidium (BET, Euromedex). Après récupération des échantillons après la digestion à 37°C, ceux-ci sont complétés avec le tampon de dépôt Gel Loading Dye de NEB pour une concentration de 1X final. Les échantillons sont alors déposés sur gel, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (marqueur Genruler 100 bp ou marqueur Genruler 1 kb de Thermo Fischer Scientific selon les tailles attendues). La migration est effectuée dans le tampon TAE 1X à 100 V. Après environ 30 min de migration, le gel d'agarose est exposé sur un système de révélation aux UV, une caméra Fusion Fx (Vilber) pour acquisition des photographies de gel ou sur un générateur d'UV pour découper les bandes de gel selon les besoins.

### 4. Description des plasmides et de leur construction

#### a) *FIV p24 ΔCPT*

Le plasmide utilisé initialement est celui créé préalablement au sein de l'équipe, le plasmique pRSET-B p24 ΔCPT (Folio *et al.*, 2017). La construction génétique contient une délétion des 9 derniers acides aminés de la séquence sauvage de FIV p24 (souche Petaluma) et portant la mutation P1T pour les besoins du clivage protéolytique de l'étiquette N-terminale par le facteur Xa. Cette construction utilise le plasmide pRSET-B (Thermo Fischer) (Figure 78).

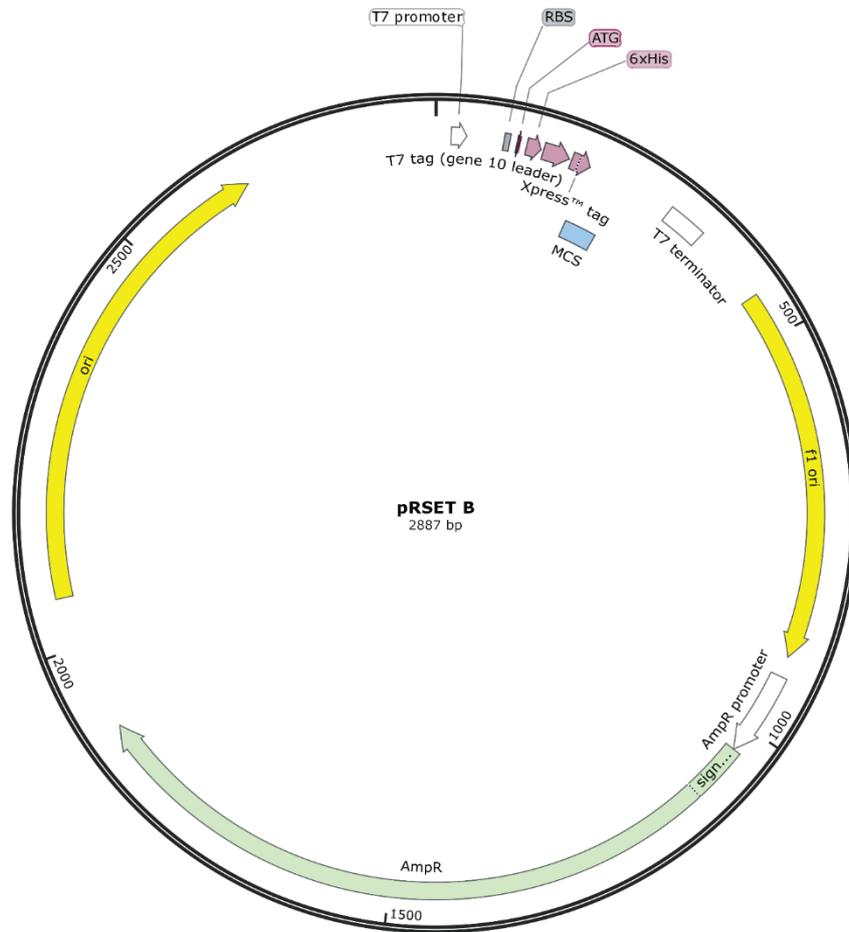


Figure 78 : Carte du plasmide pRSET-B. Le plasmide fournit un promoteur T7, une étiquette poly-histidine, l'épitope du bactériophage T7 et un site de clivage protéolytique à la thrombine dans le même cadre de lecture que le codon ATG initiateur. MCS : site multiple de clonage ; T7 terminator : site de terminaison de la T7 transcriptase ; AmpR : gène de résistance à l'ampicilline ; f1 ori : site d'origine de réplication d'ADN simple brin dérivé de l'origine de réplication du phage F1 ; ori : origine de réplication du plasmide ; RBS : site de fixation du ribosome.

Le plasmide permet une expression *via* la T7 polymérase car il contient le promoteur et le site d'initiation de la transcription de la T7 polymérase, un site de fixation du ribosome et une étiquette poly-histidine en position N-terminale en amont du site multiple de clonage. À cette étiquette portée par le plasmide, nous avons ajouté un site de clivage protéolytique pour le facteur Xa (Figure 79). La proline initiale de la protéine p24 a été mutée en thréonine pour permettre le clivage de l'étiquette par cette protéase. Ce plasmide a ensuite été amplifié par transformation en souche bactérienne NEB-5 $\alpha$ , selon les deux protocoles de transformation et d'amplification d'ADN (cf. [V.A.3](#) p139). Les souches d'expressions utilisées (voir la partie [V.B](#) page 148) possèdent le gène de la T7 polymérase, dont l'expression est induite par l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) et qui pourra initier la transcription à partir du promoteur T7 du plasmide.



Figure 79 : Extrait de la carte de plasmide pRSET-B p24  $\Delta$ CPT. Le clonage a été réalisé via les sites de restrictions BamHI et EcoRI du site multiple de clonage du plasmide pRSET-B. La construction p24  $\Delta$ CPT ajoute un site de clivage protéolytique au facteur Xa juste avant le premier acide aminé de la protéine p24.

### b) *FIV p24 EPT*

Ce plasmide a également été créé au sein de l'équipe (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013). Le plasmide apporte de la même façon une étiquette poly-histidine. Un site de clivage protéolytique au facteur Xa a également été ajouté juste avant l'acide aminé initial de p24, dont la séquence contient également la mutation P1T. Cependant, ce plasmide ne contient pas la délétion des neuf derniers acides aminés C-terminaux, présente dans la construction p24  $\Delta$ CPT. Le clonage a été réalisé en utilisant les mêmes sites de restriction BamHI et EcoRI. Le plasmide a été amplifié de la même façon que le plasmide pRSET-B p24  $\Delta$ CPT, et l'amplification du plasmide a été contrôlée par digestion aux enzymes BamHI-HF et EcoRI-HF de la même façon.

### c) *FIV p24 $\Delta$ CPT A41C/T53C*

La construction de ce mutant s'est faite avec deux PCR simultanées suivie d'une troisième PCR : les deux PCR initiales permettent de rajouter l'une ou l'autre des mutations A41C et T53C, et la troisième permet d'obtenir l'amplicon complet (Figure 80).

#### - Mutation A41C

- Amorce p24 N-terminale-Fw :

5'-AGGATCCAATAGAAGGACGAACTATTCAAACAGT-3'

- Amorce p24 A41C-Rev :

5'-GTCAGTAGGTGTTAAATTAGCAGAGAAGCAAGTAAACCATAG-3'

#### - Mutation T53C

- Amorce p24 T53C-Fw :

5'- GCTAATTTAACACCTACTGACATGGCCTGTTTAATAATGG-3'

- Amorce p24 EdC-Rev :

5'- GAATTCTCATATTTCTTGACAAGCCCTCAAC-3'

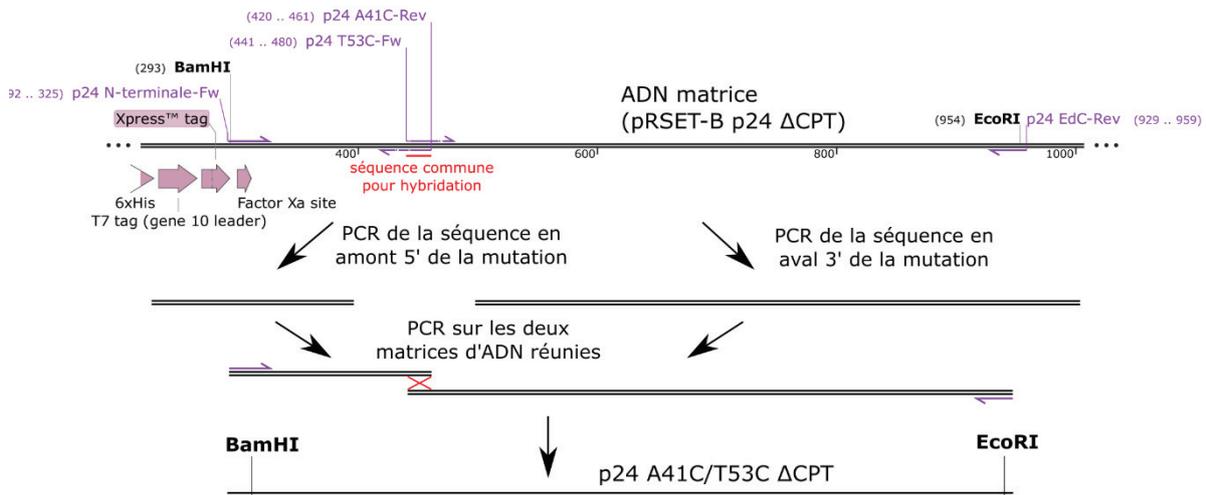


Figure 80 : Ajout des mutations A41C/T53C sur la protéine p24 ΔCPT par PCR de la partie en amont 5' et aval 3' des mutations.

Les deux premières PCR ont été réalisées avec la polymérase Q5 (NEB) selon le protocole du fournisseur, dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$ . Les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 250  $\text{nmol.L}^{-1}$  (synthétisées par Sigma-Aldrich), en présence de désoxynucléotides (dNTP, NEB) à 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , avec 0,5 UI de l'enzyme Q5 (NEB), dans le tampon Q5 reaction buffer 1X (NEB), avec 50 ng d'ADN matrice pRSET-B p24 ΔCPT. La dénaturation initiale a été réalisée à 95°C pendant 5 min, puis chaque cycle de PCR contient 30 s de dénaturation à 95°C, suivie d'une température d'hybridation de 52°C pendant 45 s, et une polymérisation à 72°C pendant 1 min, pour un total de 30 cycles. La PCR est terminée en maintenant la température à 72°C pendant 20 min pour terminer tous les processus d'élongation.

Ces produits de PCR ont été ensuite déposés sur gel d'agarose 1,5 % pour séparation par électrophorèse selon le protocole détaillé page 140. Les bandes correspondant aux tailles attendues (environ 200 et 500 pb pour la PCR de la séquence en 5' et de la séquence en 3' de la mutation) ont été découpées depuis le gel et l'ADN que les bandes contenaient a été extrait en utilisant le kit Gel & PCR clean-up (MN), suivant le protocole du fournisseur. L'élution finale de l'ADN a été réalisée dans un volume final de 15  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution du kit. La concentration en ADN de chaque élution de produit PCR a été déterminée par spectrophotométrie sur Nanodrop.

La troisième PCR a été réalisée dans des conditions similaires, en utilisant comme matrice environ 20 ng de chaque amplicon, mais avec un temps d'hybridation et d'élongation de 2 min par cycle. Les amorces utilisées sont les amorces p24 N-terminale-Fw et p24 EdC -Rev ci-dessus. L'amplicon obtenu a été purifié depuis le mélange réactionnel par le kit Gel & PCR clean-up (MN) selon le protocole du fournisseur et élué dans un volume final de 15  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution du kit. L'amplicon purifié, ainsi que 500 ng de vecteur pRSET-B, ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction BamHI-HF et EcoRI-HF (NEB) avec 1 UI de chaque enzyme, dans le tampon Cutsmart 1X (NEB) dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$ ,

1 h à 37°C. Le vecteur digéré a de plus été déphosphorylé par la phosphatase alcaline de veau (CIAP) de NEB, en ajoutant 1 µL de CIAP dans le volume réactionnel pendant 20 min, puis la phosphatase a été inactivée à 65°C pendant 15 min.

Les produits de digestion ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 1 % et les bandes correspondant aux poids moléculaires attendus (2 900 pb et 700 pb environ pour le vecteur et l'insert, respectivement) ont été découpées. Les ADN ont été extraits à l'aide du kit Gel & PCR clean-up, puis élués dans un volume final de 15 µL de tampon d'éluion du kit et les concentrations solutions d'ADN obtenues ont été mesurées sur Nanodrop. Environ 50 ng de vecteur et la quantité adéquate d'insert pour un ratio molaire de 1:3 vecteur:insert ont été mélangés pour effectuer la ligation. La ligation a été réalisée dans un volume réactionnel de 15 µL avec 1 µL de l'enzyme T4 ligase (Lucigen), dans le tampon T4 ligase buffer 1X fourni avec l'enzyme, à 14°C pendant 16 h. La ligase est ensuite inactivée à 65°C pendant 20 min. Des bactéries TOP10 ont ensuite été transformées avec ce produit de ligation selon le protocole préalablement décrit, avec l'ampicilline comme antibiotique de sélection.

Entre 4 et 10 colonies de la boîte de Pétri de transformation ont été mises en culture selon le protocole de minipréparation préalablement décrit pour en extraire l'ADN (voir V.A.2 page 139). Le contrôle des plasmides obtenus s'est fait par digestion par les mêmes enzymes que celles utilisées pour le clonage, et les plasmides dont les fragments de digestion correspondent aux tailles attendues après migration sur gel d'agarose 1 % ont été envoyés au séquençage (technique Sanger, Eurofins Genomics), en utilisant les amorces T7 et T7 term du prestataire. Les résultats de séquençage sont visualisés par le logiciel SnapGene Viewer (version 4.3.10).

#### d) *FIV p24 ΔCPT A13C/A44C*

La mutagenèse a été réalisée de façon similaire à précédemment, mais avec 3 PCR simultanées dont les amplicons peuvent s'hybrider lors de la seconde étape de PCR (Figure 81). Les amorces utilisées sont les suivantes :

- Fragment N-terminal :
  - Amorce p24-RBS : 5'-CTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC-3'
  - Amorce p24-A13C-Rev :  
5'- CCATTTTTGGGTCAAGGCATACATATTGTGGTACCCCATTTAC -3'
- Fragment central :
  - Amorce p24-A13C-Fw :  
5'- GTAAATGGGGTACCACAATATGTATGCCTTGACCCAAAAATGG-3'
  - Amorce p24-A44C-Rev :  
5'- CAGTAGGTGTTAAATTGCAAGAGAAGGCAGTAAACC-3'
- Fragment C-terminal :

- Amorce p24-A44C-Fw :  
5'-TGGTTTACTGCCTTCTCTTGCAATTTAACACCTACTG-3'
- Amorce p24 C-terminale-Rev :  
5'- GAATTCTCATATTTCTTGACAAGCCCTCAAC-3'

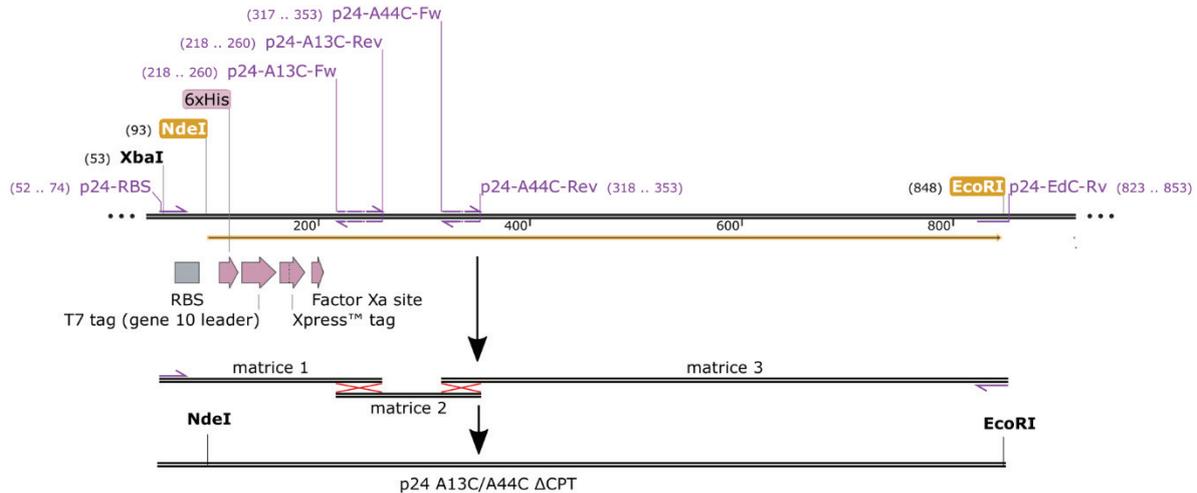


Figure 81 : Processus d'ajout des mutations A13C/A44C sur p24  $\Delta$ CPT.

Les PCR ont été réalisées de la même façon que précédemment, les bandes attendues (environ 200, 140 et 500 pb) ont été extraites et les amplicons utilisés comme matrice *via* 25 ng de chaque, pour une PCR *via* les amorces p24-RBS et p24 C-terminale-Rev, en une seule étape de PCR avec hybridation des 3 matrices (Figure 81). La digestion pour clonage en pRSET-B a été réalisée *via* les enzymes NdeI et EcoRI-HF (NEB). Le produit de ligation a servi pour une transformation en bactéries TOP10 sur boîte ampicilline. Quatre à dix colonies ont été mises en culture pour réaliser une minipréparation puis les plasmides obtenus ont été vérifiés par digestion et séquençage comme la mutation précédemment décrite (V.A.4.c) page 142).

#### e) *FIV p24-pET $\Delta$ CPM*

Le plasmide pET-28(a) (Novagen, Figure 82) a été amplifié par minipréparation (NucleoSpin Plasmid (MN) élution dans 50  $\mu$ L) pour disposer d'une quantité importante de vecteur, en utilisant la kanamycine comme antibiotique de sélection.

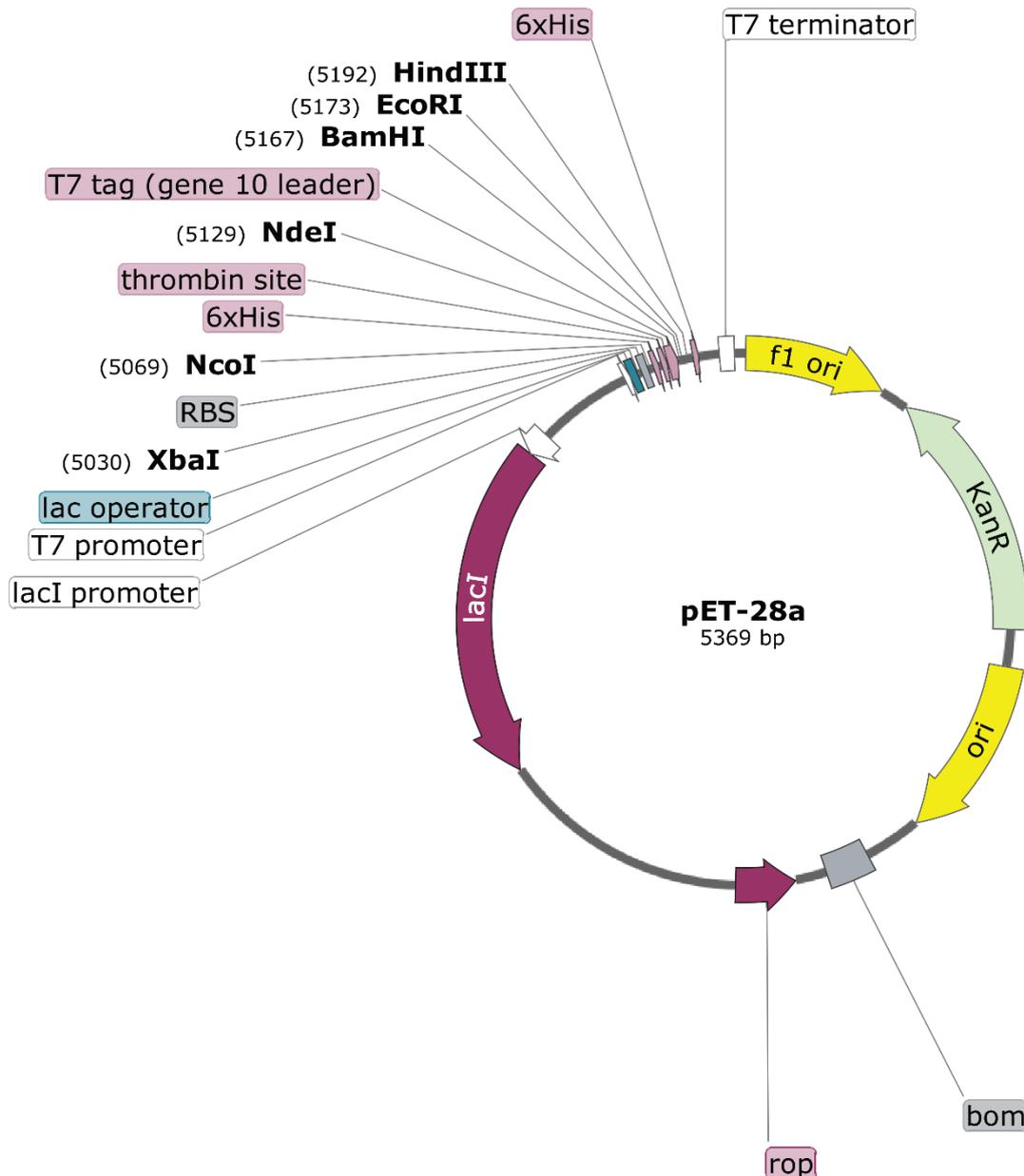


Figure 82 : Carte du plasmide pET-28a. f1 ori : site d'initiation de la réplication simple brin du phage T1 ; KanR : gène de résistance à la kanamycine ; ori : origine de réplication ; bom : région de mobilité pour le transfert conjugatif ; rop : répresseur de la réplication ; lacI et lacI promoteur : gène et promoteur du répresseur LacI de l'opéron lactose ; T7 promoteur : site d'initiation de la transcription de la T7 polymérase ; lac operator : opérateur de l'opéron lactose ; RBS : site de fixation du ribosome ; 6xHis : étiquette poly-histidine ; thrombin site : site de coupure à la thrombine ; T7 tag : épitope du phage T7 ; T7 terminator : site de terminaison de la transcription de la polymérase T7. Certains sites de restriction uniques pouvant être utilisés sont indiqués en gras. Les éléments notés sur fond rose indiquent des éléments situés dans le même cadre de lecture que le codon initiateur ATG.

Seul le gène codant p24  $\Delta$ CPT a été cloné dans ce vecteur. L'insert a été obtenu par PCR, dans un volume réactionnel équivalent à celui décrit préalablement. La matrice correspond à 50 ng de plasmide pRSET-B p24  $\Delta$ CPT. Les deux amorces

utilisées permettent l'amplification de l'insert et ajoutent les sites de restriction utilisés pour le clonage. Les amorces sont :

- Amorce p24-N-terminal-NcoI : 5'-TTCCCATGGTTCAAACAGTAAATGG-3'
- Amorce p24-C-terminal-Rev : 5'-GGCGAATTCACACTATTTCTTGACAAGCCC-3'

La PCR a été réalisée comme précédemment (voir partie [V.A.4.c](#)) page 142) mais avec 35 cycles. L'amplicon directement issu de la réaction a été purifié *via* le kit Gel & PCR clean-up (MN), selon le protocole du fournisseur et élué dans 15 µL de tampon d'éluion du kit. L'insert et le vecteur ont été digérés par les enzymes de restriction NcoI-HF et EcoRI-HF (NEB) et le vecteur déphosphorylé par l'enzyme CIAP comme précédemment. Le produit de digestion a été déposé sur gel d'agarose 1 %. Après migration, les bandes correspondant aux tailles attendues (environ 800 pb et 5 kpb) ont été découpées depuis le gel et l'ADN contenu dans les bandes a été extrait (kit Gel & PCR clean-up (MN) éluion dans 15 µL). L'ADN a été dosé par spectrophotométrie sur Nanodrop. La ligation a été réalisée comme précédemment dans 15 µL, avec environ 50 ng de vecteur digéré et un insert en quantité suffisante pour un ratio molaire de 1:3 vecteur:insert. Des bactéries TOP10 ont été transformées avec ce produit de ligation et étalement sur boîte LB agar kanamycine. Quatre à dix clones ont été mis en culture pour réaliser une minipréparation avec la kanamycine comme antibiotique de sélection. Le contrôle des plasmides, extraits avec le kit NucleoSpin Plasmid (MN) avec éluion dans 50 µL de tampon d'éluion du kit, a été réalisé par digestion avec les enzymes NcoI-HF et EcoRI-HF et les plasmides dont les fragments de digestion correspondaient aux tailles attendues (environ 700 et 5300 pb) ont été envoyés pour séquençage Sanger comme précédemment.

#### f) *FIV p24 ΔCPT C61S*

La mutation C61S a été introduite sur les constructions p24 ΔCPT, p24 ΔCPT A13C/A44C et p24 ΔCPT A41C/T53C par une autre méthode que celle décrite préalablement. La mutation a été introduite par PCR sur plasmide entier *via* les amorces suivantes :

- Amorce p24-C61S-Fw : 5'-GGCCGCACCAGGATCCGCTGCAGATAAAG-3'
- Amorce p24-C61S-Rev : 5'-CTTTATCTGCAGCGGATCCTGGTGCGGCC-3'

Le mélange réactionnel de PCR a été préparé comme préalablement. La PCR cependant a été réalisée en 35 cycles, *via* une dénaturation à 95°C pendant 1 min, une hybridation à 52°C pendant 30 s et une polymérisation à 72°C pendant 5 min, pour permettre de réaliser la polymérisation du plasmide en entier. La PCR s'est terminée par une étape à 72°C pendant 20 min pour terminer tous les processus de polymérisation.

Le produit de PCR a été purifié (kit Gel & PCR clean-up (MN) éluion dans 15 µL). Ce produit de PCR a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction DpnI, qui ne clive que l'ADN méthylé, dans un volume réactionnel de 20 µL, dans le tampon

Cutsmart 1X (NEB) avec 2  $\mu$ L d'enzyme DpnI (NEB) pendant 2 h à 37°C. Seul le plasmide matrice initial, provenant d'une synthèse par des bactéries, contient des méthylations et l'ADN synthétique issu de la PCR n'en contient pas. La digestion dirigée contre l'ADN méthylé uniquement permet de ne conserver que le plasmide désiré. Ce produit de digestion a ensuite été purifié (kit Gel & PCR clean-up (MN) élution dans 15  $\mu$ L du tampon d'élution du kit). Le plasmide obtenu a été utilisé directement pour une transformation en TOP10 avec l'ampicilline comme antibiotique de sélection. Huit clones ont été mis en culture pour une minipréparation (NucleoSpin Plasmid (MN) élution dans 50  $\mu$ L). Les plasmides ont été contrôlés par digestion par les enzymes BamHI-HF et EcoRI-HF, suivie d'un séquençage par le prestataire Eurofins Genomics.

*g) FIV p24E A41C/T53C, p24E A13C/A44C, p24E C61S, p24E ATC et p24E AAC*

Les différentes mutations sur la protéine p24E ont été effectuées de la même façon que pour la protéine p24  $\Delta$ CPT. Brièvement, les mutations A41C/T53C et A13C/A44C ont été rajoutées par la technique de PCR en deux étapes et la mutation C61S par PCR sur plasmide entier, qui a formé les plasmides p24E C 1S, p24E A41C/T53C/C61S (p24E ATC) et p24E A13C/A44C/C61S (p24E AAC).

Pour les plasmides p24E A41C/T53C et p24E A13C/A44C, le protocole a été identique à celui décrit page 142 et page 144. Seule l'amorce correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine a été modifiée :

- Amorçe p24E-Rev : 5'- GAATTCTCAGAGTTGCATTTTATATCCTG-3'

Les PCR, purifications d'ADN, ligations finales, amplification d'ADN et séquençage ont été réalisés depuis le plasmide pRSET-B p24E comme ADN matrice, aboutissant à la construction des plasmides pRSET-B p24E A41C/T53C et pRSET-B p24E A13C/A44C.

La mutation C61S a été rajoutée de la même façon que pour la protéine p24  $\Delta$ CPT, par PCR sur plasmide entier avec les amorces p24-C61S-Fw et p24-C61S-Rev (voir la partie [V.A.4.f](#)) page 147), sur les plasmides pRSET-B p24E, pRSET-B p24E A41C/T53C et pRSET-B p24E A13C/A44C. Les produits de PCR ont été traités de façon similaire, jusqu'à l'obtention des plasmides pRSET-B p24E C61S, pRSET-B p24E ATC et pRSET-B p24E AAC.

## B. Expression des protéines

### 1. Production de protéine non marquée

#### *a) Production en souche T7 Express*

La souche T7 Express de *E. coli* de NEB est adaptée pour l'expression des protéines cytosoliques. Elle permet une synthèse des protéines placées sous le contrôle du promoteur T7 par une induction de l'expression par l'IPTG. Les bactéries sont transformées par les différentes constructions plasmidiques décrites préalablement (voir la partie [V.A.4](#) page 140) *via* le protocole préalablement décrit. Les produits de transformation sont étalés sur boîte de LB agar avec

l'antibiotique adéquat (kanamycine pour p24-pET $\Delta$ CPM, ampicilline pour les constructions en pRSET-B).

La veille de la culture, un clone sur boîte a été prélevé pour réaliser une préculture sur la nuit (environ 14 h), dans un volume de 50 mL de LB complété avec l'antibiotique adéquat, aux mêmes concentrations que préalablement. La préculture a été réalisée à 37°C avec une agitation à 160 rpm. Le lendemain, 2 L de milieu de culture LB (Sigma-Aldrich) ont étéensemencés avec 20 mL de volume de préculture par litre de volume de culture. La culture a été réalisée à 37°C sous agitation à 140 rpm et la densité optique mesurée par spectrophotométrie à 600 nm à intervalles réguliers. Quand la mesure de densité optique DO<sub>600</sub> a atteint 0,4, l'expression des protéines a été induite par l'ajout de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM, sauf mention contraire. L'induction a été réalisée sur la nuit à 25°C sous agitation à 140 rpm. Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées à 6 000  $\times$  g à 4°C pendant 10 min. Les culots bactériens ont été récupérés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

#### b) *Production en souche SHuffle*

Le plasmide pRSET-B p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C a également été utilisé pour transformer, de la même façon que précédemment, la souche SHuffle de *E. coli* de NEB. La veille de la culture, un clone a servi pour ensemencer 50 mL de préculture de LB complété à 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et incubée sur la nuit à 37°C, 160 rpm. Puis un volume de culture de 2 L de LB, même concentration en ampicilline, a étéensemencé par 40 mL de préculture. La culture a été réalisée selon les instructions du fournisseur, à 30°C, 140 rpm. La croissance bactérienne a été suivie par spectrophotométrie et l'expression des protéines induites à l'IPTG 1 mmol.L<sup>-1</sup> lorsque la densité optique a atteint 0,6. L'expression a été réalisée à 37°C pendant 4 h à 140 rpm puis les bactéries ont été sédimentées de la même façon que précédemment et conservées à -20°C.

## 2. Production de protéine pour les expériences de RMN

Pour les besoins de l'acquisition des données RMN, à l'exception des expériences de *Saturation Transfer Difference*, un marquage des isotopes était nécessaire pour les expériences. Pour ces expériences de RMN, la production d'échantillons marqués est réalisée dans des milieux de culture enrichis en isotopes. J'ai donc utilisé un milieu pauvre, le M9, complété avec les éléments marqués.

#### a) *Simple marquage <sup>15</sup>N*

Pour les protéines marquées uniquement au <sup>15</sup>N (pour les <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N - HSQC), le milieu M9 a été produit selon les recommandations du laboratoire EMBL (European Molecular Biology Laboratory, [https://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/protein\\_expression/ecoli/n15/](https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/n15/)). Le milieu M9 a été produit en ajoutant, à 2 L d'eau distillée, 12 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl et 1 g de <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (tous fournis par Sigma-Aldrich). Le mélange a été stérilisé par un cycle d'autoclave et complété avec 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 8 g de glucose, 1  $\times$  vitamine MEM et 1 g de

facteur de croissance ISOGRO®-<sup>15</sup>N Powder-Growth medium, tous fournis par Sigma-Aldrich également. Les solutions de CaCl<sub>2</sub> et de MgSO<sub>4</sub> ont été stérilisées préalablement par un cycle d'autoclave. Les vitamines, le glucose, et le complément de croissance ISOGRO sont stérilisés à l'aide d'un filtre stérile 0,22 µm (Merck Millipore).

La préculture a été réalisée la veille dans un volume de 20 mL de LB à 37°C. Les bactéries ont été collectées après centrifugation à 6 000 × g à température ambiante pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé pour retirer les facteurs nutritifs non marqués et les bactéries ont ensuite été resuspendues dans du milieu de culture M9 <sup>15</sup>N. La resuspension a été utilisée pour ensemercer la culture, dont la croissance a été suivie et induite par l'IPTG à une densité optique de 0,4 comme pour les protéines non marquées.

*b) Double marquage <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C*

Le double marquage aux deux isotopes a été effectué de la même façon que précédemment, en remplaçant les sources de carbone par des éléments uniformément marqués au <sup>13</sup>C. Ainsi, 2 L de milieu M9 ont été produits de la même façon, en rajoutant à la place du glucose non marqué, 4 g de glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (Euriso Top), ainsi que 1 g de ISOGRO®-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N Powder -Growth Medium (Euriso Top) à la place du ISOGRO®-<sup>15</sup>N Powder-Growth medium, et sans la complémentation de vitamine MEM.

La préculture a été réalisée sur la nuit dans un volume de 50 mL de LB. Le lendemain, la DO<sub>600</sub> de cette préculture a été mesurée pour déterminer le volume à prélever pour atteindre une DO de 0,1 dans le volume de culture après ensemencement. Ce volume de préculture a été prélevé et les bactéries centrifugées comme précédemment, puis resuspendues pour ensemercer le volume de culture en milieu M9 <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N. L'expression a également été induite selon le protocole du simple marquage.

*c) Triple marquage <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, D*

Le marquage supplémentaire au deutérium a été réalisé en milieu M9 selon le protocole du double marquage au <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N, dans un volume final de 2 L, en remplaçant :

- l'eau distillée par de l'eau lourde D<sub>2</sub>O (99,8 %, 2 L, Sigma-Aldrich).
- le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> par un glucose deutéré, 4 g de glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,1,2,3,4,5,6,6-d<sub>7</sub> (Euriso Top).
- en ajoutant 1 g de ISOGRO®-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N,D Powder-Growth Medium (Euriso Top) au lieu de ISOGRO®-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N Powder -Growth Medium.

La solution de milieu M9 dans l'eau lourde D<sub>2</sub>O a été stérilisée grâce à une unité de filtration 0,22 µm stérile (Merck Millipore). L'ensemencement de la culture et l'induction de l'expression protéique ont été réalisés de la même façon que pour le double marquage.

#### d) Préparation de l'échantillon non marqué pour l'expérience de STD

Un échantillon de protéine p24  $\Delta$ CPT non marquée a été utilisé. Après purification (voir ci-dessous), la protéine est préparée dans le tampon NaP<sub>i</sub> pH 6,8 50 mM, NaCl 50 mM à une concentration de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> (106  $\mu$ M) et stockée à -80°C. La protéine a été décongelée et le tampon a été changé contre un tampon identique produit dans l'eau lourde D<sub>2</sub>O (99.8 %), à l'aide d'une colonne de dessalage Zeba SpinDesalt 0,5 mL équilibrée préalablement dans le tampon de destination. Ce même tampon deutéré a servi à la dilution de l'échantillon à 20  $\mu$ M.

### C. Purification de la protéine

Les constructions génétiques utilisées contiennent une étiquette de purification poly-histidine, adaptée pour permettre une purification des protéines par chromatographie d'affinité pour le métal immobilisé sur résine (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC). Cette étape de chromatographie a pu être réalisée soit sur système à pression (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) soit par gravité sur résine en suspension (batch).

#### 1. Lyse des culots bactériens

Les culots bactériens obtenus préalablement et stockés à -20°C ont été décongelés sur glace, dans un tampon différent selon la technique de purification. Pour une purification en batch, les culots ont été resuspendus dans un tampon NaP<sub>i</sub> 50 mM, pH 8 et NaCl 300 mM. Ce tampon a également été utilisé pour la lyse et le lavage de la résine. Pour une purification en FPLC, les culots ont été resuspendus dans un tampon NaP<sub>i</sub> 50 mM pH 7,4 et NaCl 300 mM.

Le tampon de lyse a été complété avec du lysozyme de blanc d'œuf à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) et de la DNase à 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) pour lyser les parois bactériennes et l'ADN génomique libéré au cours de la lyse, selon le protocole préalablement établi (Folio *et al.*, 2017).

La lyse a été réalisée ensuite par sonication aux ultrasons (40 % de puissance, cycles de 2 min) 3 fois au moins, jusqu'à ce que le lysat ne soit plus visqueux. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (11 000  $\times$  g, 4°C, 45 min) et le surnageant a été récupéré et filtré sur filtre 0,2  $\mu$ m pour limiter l'injection de débris et grosses particules sur la résine et dans les colonnes de purification.

#### 2. Purification en batch

La purification en batch a été utilisée pour préparer les échantillons de p24  $\Delta$ CPT marquée pour la RMN, une partie des échantillons de p24  $\Delta$ CPT non marquée sauvage ou mutée, p24  $\Delta$ CPT A13C/A44C, p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C, p24  $\Delta$ CPT C61S, p24  $\Delta$ CPT AAC, p24  $\Delta$ CPT ATC et pour produire les échantillons de p24E, p24E A41C/T53C et p24E A13C/A44C pour les expériences de RMN, de cristallogenèse de thermophorèse, d'ITC ou pour le test d'assemblage.

Le filtrat a été mélangé à la résine Ni-TED selon le protocole publié (Folio *et al.*, 2017). L'élution a été réalisée en utilisant un tampon NaP<sub>i</sub> 50 mM pH 8, NaCl 300 mM

et imidazole 50 mM. L'analyse de la pureté des fractions a été réalisée sur SDS-PAGE selon le protocole décrit dans la partie V.E page 154. Les concentrations en protéine des fractions d'éluion ont été dosées par spectrophotométrie basée sur l'absorbance à 280 nm sur Nanodrop. Les fractions contenant la protéine pure ont été réunies et concentrées sur concentrateur Vivaspin 20 (10,000 MWCO, poly(éther sulfone)), permettant une concentration et un changement de tampon contre un tampon de stockage  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM. La concentration a été réalisée par cycles de centrifugation à  $6\,000 \times g$  à 4°C pendant 30 min. La fraction retenue a été diluée dans le tampon de stockage, après chaque cycle de concentration, jusqu'à ce que le facteur de dilution cumulatif soit d'au moins 100. Les derniers cycles de centrifugation permettent alors de concentrer la protéine pour les étapes ultérieures. La concentration de la protéine est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm sur Nanodrop.

### 3. Purification en chromatographie FPLC

La chromatographie liquide de protéine (*Fast Protein Liquid Chromatography*) a été utilisée pour produire la protéine p24-pET $\Delta$ CPM et une partie des échantillons de p24  $\Delta$ CPT sauvage ou mutée pour la cristallogenèse.

Les purifications en FPLC ont été réalisées à l'aide d'un système de chromatographie Äkta Pure (GE Healthcare). Le filtrat a été injecté sur résine d'affinité pour le métal HiTrap TALON crude 1 mL (Sigma Aldrich). Le tampon d'équilibration et de lavage de la résine correspond au tampon de lyse  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM. La résine a ensuite été lavée avec 10 mL de tampon de lavage. Un second lavage a été réalisé en mélangeant 90 % de tampon de lavage et 10 % de tampon d'éluion ( $\text{NaP}_i$  50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, imidazole 150 mM) pendant 5 mL.

Différentes stratégies d'éluion ont ensuite été réalisées selon les échantillons :

- pour les protéines exprimées en système SHuffle, un gradient de 10 % jusqu'à 100 % de tampon d'éluion sur un volume total de 15 mL.
- pour les protéines p24-pET $\Delta$ CPM, l'éluion est réalisée avec 5 mL de tampon d'éluion à 50 %.
- pour les protéines p24 en vecteur pRSET-B purifiées en FPLC, un lavage supplémentaire en 5 mL à 20 % de tampon d'éluion est réalisé puis l'éluion a été réalisée avec 5 mL de tampon d'éluion à 100 %.

Les fractions ont été analysées sur SDS-PAGE, à 12 % d'acrylamide, en déposant sur gel aussi bien les fractions d'éluion que les fractions non retenues sur colonne et les fractions de lavage.

Les fractions d'éluion de la protéine p24-pET $\Delta$ CPM ont été réunies puis injectées via un système Äkta Pure sur colonne de dessalage HiPrep™ 26/10 Desalting (GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon de stockage (HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM, ou Tris pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM). La fraction d'éluion de

la protéine a été récupérée, puis dosée sur Nanodrop. Le volume d'élution a été concentré sur Vivaspin 20 20 (10,000 MWCO, poly (éther sulfone)) par cycles de centrifugation à  $6\,000 \times g$  de 20 min à 4°C puis la concentration finale a été mesurée sur Nanodrop.

Pour les protéines p24 en vecteur pRSET-B, les fractions d'élution ont été réunies et le dessalage s'est fait de la même façon que pour la protéine p24-pETΔCPM, contre un tampon NaPi 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM. Les contaminants de ces éluions ont été éliminés par chromatographie échangeuse d'anion. L'échantillon dessalé a été injecté *via* le système Äkta sur une colonne d'échange d'anion HiTrap® Q HP 1 mL (GE Healthcare). Le tampon d'équilibration-lavage correspond au tampon de dessalage NaPi 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM. Le tampon d'élution est un tampon NaPi 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M. Après injection, la colonne a été lavée par 10 mL de tampon de lavage, puis un gradient de 0 à 100 % de tampon d'élution sur 15 mL a été réalisé pour éluer.

Les fractions ont été analysées sur SDS-PAGE et les fractions contenant la protéine ont été réunies et dessalées en utilisant la même colonne de dessalage HiPrep™ 26/10 Desalting, dans le même tampon NaPi 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, ou dans le tampon HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM, selon l'utilisation à venir de l'échantillon. L'échantillon de sortie de chromatographie de dessalage a été concentré sur concentrateur Vivaspin 20 (10,000 MWCO, poly (éther sulfone)) par cycles de centrifugation à  $6\,000 \times g$  de 20 min à 4°C et la concentration suivie par spectrophotométrie à 280 nm sur Nanodrop.

#### D. Clivage de l'étiquette au facteur Xa et purification

Le protocole de clivage ne concerne pas les échantillons p24-pETΔCPM, dont l'étiquette ne contient pas de site de clivage protéolytique. Les étiquettes des échantillons produits *via* le vecteur pRSET-B portent une séquence de clivage au facteur Xa.

Les échantillons ont été dilués à une concentration de  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en tampon HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM ou NaPi pH 7,4, 50 mM. Puis 10 µg de facteur Xa (NEB) ont été ajoutés par milligramme de protéine. La protéolyse a ensuite été réalisée sur la nuit à 19°C. Le lendemain, un aliquot du produit de lyse a été analysé sur gel pour vérifier l'efficacité du clivage protéolytique.

Le facteur Xa a été inactivé dans un premier temps sur glace. Le facteur Xa et l'étiquette libérée par le clivage ont ensuite été retirés de la solution par l'utilisation de résines fixant l'un et l'autre de ces composés, à savoir la résine Xa capture Xarrest (Merck Millipore) et une résine Ni-NTA (MN), respectivement. Pour la résine Xarrest, la quantité de résine utilisée correspond à 50 µg de résine pour 10 µg de facteur Xa, et pour la résine Ni-NTA, à 0,1 mL de résine par milligramme de protéine initiale.

Ces résines ont été lavées deux fois en eau par élimination du surnageant après 5 min de centrifugation à  $1\,000 \times g$  à 4°C, puis resuspension dans un volume d'eau équivalent au volume de surnageant éliminé. Après une troisième centrifugation,

le mélange de résine a été resuspendu dans un tampon Tris pH 8, 1 M, avec 100  $\mu$ L de ce tampon par mg de protéine initiale. La résine a été mélangée avec le produit de protéolyse et le mélange a été incubé à 4°C sur agitateur rotatif pendant 30 min. La résine a été centrifugée à 10 000  $\times$  g et le surnageant récupéré puis concentré sur Vivaspin 20 (10,000 MWCO). Au cours de la concentration, le tampon de la protéine a été changé contre le tampon de stockage en fonction des utilisations ultérieures :

- analyse, en RMN, ITC ou tests d'assemblage : NaPi 50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM
- cristallogénèse : plusieurs tampons utilisés, selon les conditions testées
  - HEPES 50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM
  - HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM
  - HEPES 50 mM pH 7,4
  - Tris-base 50 mM pH 8, NaCl 50 mM
  - Tris-base 50 mM pH 8, NaCl 300 mM
  - Bis-Tris 50 mM pH 6, NaCl 50 mM
  - Bis-Tris 50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM
  - Bis-Tris 50 mM pH 6,8, NaCl 500 mM

Les concentrations des protéines ont ensuite été dosées par spectrophotométrie UV à 280 nm sur Nanodrop. Les échantillons de protéine ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation ou utilisés le jour-même pour réaliser des cristaux en plaque 96 puits.

## E. Séparation des protéines sur SDS-PAGE

Les échantillons de protéine à analyser ont été mélangés à du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) (concentration finale 1X) et incubés à 90°C pendant 5 min. Le tampon Laemmli utilisé était complété par du  $\beta$ -mercaptoéthanol (concentration finale dans le tampon Laemmli 1X 200 mM) pour les gels réducteurs, ou n'était complété par aucun agent réducteur pour les gels non réducteurs.

Les échantillons dénaturés ont ensuite été utilisés immédiatement ou ont été congelés à -20°C jusqu'à l'électrophorèse en SDS-PAGE selon le protocole suivant. Les gels de séparation sont préparés dans un mélange Tris pH 8, SDS 0,4 %, acrylamide-bisacrylamide (ratio 37,5:1) à concentration entre 10 et 15 % selon la taille des bandes attendues ; 12 ou 15 % pour un contrôle de la pureté de l'échantillon, 10 ou 12 % pour les analyses de formation de ponts disulfures. Les gels de concentration sont préparés dans un mélange de tampon Tris pH 6,8, SDS 0,4 %, acrylamide-bisacrylamide 4%.

La migration s'est faite par électrophorèse à 100 V jusqu'à ce que les échantillons aient quitté le gel de concentration et aient atteint le gel de séparation, et migration à 150 V après. Après migration, les gels ont ensuite été colorés au dérivé du bleu de Coomassie, InstantBlue (Expedeon). Les images de gel ont été acquises sur scanner, ou *via* la caméra Fusion Fx (Vilber), numérisant à une plus haute résolution les scans de gel. Les images acquises sur la caméra Fusion Fx figurant dans ce manuscrit sont en noir et blanc et sur scanner, en couleur.

## F. Immunodétection sur membrane de la protéine p24E A41C/T53C/C61S

L'immunodétection a été mise en place pour vérifier l'expression et la purification de p24E ATC. Les échantillons à analyser ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12 % selon le protocole précédemment décrit. Après migration sur gel, le gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protran™ Premium 0,2 µm, GE Healthcare), dans le tampon de transfert 100 mM CAPS pH 11, 10 % éthanol, à 400 mA pendant 45 min. Après transfert sur membrane, la membrane a été bloquée par incubation pendant 1 h dans le tampon PBS-T (PBS 1 X, Tween 20 0,1 %), 5 % lait en poudre (Régilait) à température ambiante sous agitation (50 rpm). Après incubation, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire anti poly-histidine (IgG de souris, Sigma Aldrich) sur la nuit à 4°C. L'anticorps a été dilué à 1/8 000 dans le tampon PBS-T, 5 % lait en poudre.

Le lendemain, la membrane a été lavée trois fois avec le tampon PBS-T à température ambiante sous agitation (50 rpm) pendant 10 min. L'anticorps secondaire (anticorps anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline, Sigma Aldrich) a été dilué à 1/10 000 dans le tampon PBS-T. La membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 h à température ambiante sous agitation (50 rpm). La membrane a été lavée 2 fois pendant 10 min dans le tampon PBS-T à température ambiante puis 1 fois dans le tampon PBS 1X pendant 10 min.

Une pastille d'agent de révélation de la phosphatase alcaline SIGMAFAST BCIP®/NBT (Sigma Aldrich) a été diluée dans 10 mL d'eau. Après le dernier lavage, la membrane a été incubée dans cette solution le temps nécessaire à l'apparition des bandes mais avant que la membrane ne soit colorée de façon aspécifique, puis rincée immédiatement en eau. Une photographie de la membrane a été prise la caméra Fusion Fx.

## G. Test de dimérisation de la protéine p24 ΔCPT

La capacité de la protéine <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N p24 ΔCPT à former des dimères a été testée selon le protocole précédemment publié (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013). Un aliquot de 60 µL de la protéine ΔCPT à 2,6 mg.mL<sup>-1</sup> (120 µM) marquée pour la RMN a été prélevé et conservé à 19°C. De cette solution, deux aliquots de 10 µL chacun ont été prélevés le jour-même, le lendemain et le surlendemain. Pour chaque jour, un aliquot a été dénaturé en tampon Laemmli immédiatement ou traité à un agent réticulant, le bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>) selon le protocole décrit (Serrière, Fenel, *et al.*, 2013), puis dénaturé en tampon Laemmli. Les aliquots

dénaturés ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis déposés sur gel SDS-PAGE 12 % pour analyse de la dimérisation.

## H. Formation des ponts disulfures par incubation et analyse

Les protéines portant les mutations A41C/T53C ou A13C/A44C, une fois purifiées, ont été incubées en conditions oxydantes pour favoriser la formation des ponts disulfures. Ces échantillons ont ensuite été analysés pour vérifier la formation de ces ponts.

### 1. Formation des ponts disulfures

#### a) *Incubation des échantillons en conditions oxydantes*

L'objectif est de vérifier si les ponts disulfures attendus (entre les cystéines 41 et 53 ou 13 et 44 entre deux chaînes peptidiques différentes) se forment spontanément.

Un échantillon de protéine p24  $\Delta\text{CPT A41C/T53C}$  a été produit selon le protocole décrit préalablement dans la partie Purification de la protéine page 151, dans le tampon  $\text{NaP}_i$  pH 6,8, NaCl 50 mM, complété à 5 % de DMSO comme agent oxydant. L'échantillon a été concentré sur concentrateur Vivaspin 20 (10,000 MWCO poly(éther sulfone)) à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . L'échantillon a été incubé tel quel à  $19^{\circ}\text{C}$  sur une semaine, en prélevant deux aliquots de  $50 \mu\text{L}$  de façon séquentielle le jour même, le lendemain, 3 jours après et au bout d'une semaine pour analyse. Pour chaque temps d'incubation, un aliquot a été dénaturé en tampon Laemmli (concentration finale 1X) préparé sans agent réducteur dans le mélange pour conserver les ponts disulfures, et l'autre au tampon Laemmli (concentration finale 1X) avec  $\beta$ -mercaptoéthanol (concentration finale 200 mM), afin de comparer le profil de migration électrophorétique avec et sans réduction des ponts disulfures.

Deux autres échantillons, un de p24  $\Delta\text{CPT A41C/T53C}$  et un de p24  $\Delta\text{CPT A13C/A44C}$ , préparés dans le tampon HEPES pH 7,4, NaCl 50 mM, sans DMSO, préparés la veille et conservés à  $19^{\circ}\text{C}$  sur la nuit, concentrés à  $8,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $12 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivement, ont été injectés sur colonne de filtration sur gel pour séparer les oligomères formés selon leur degré d'oligomérisation. La chromatographie a été réalisée sur le système Äkta Pure, avec une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). La colonne a été équilibrée dans un tampon HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM. Un volume d'échantillon de  $50 \mu\text{L}$  a été injecté sur la colonne et l'élution a été collectée en fractions de 1 mL. Les fractions d'élution ont été analysées de la même façon que préalablement, sur SDS-PAGE réducteur ou non réducteur.

Un échantillon de protéine p24  $\Delta\text{CPT ATC}$  et un de p24  $\Delta\text{CPT AAC}$  ont été produits de façon similaire dans le tampon HEPES pH 7,4, NaCl 50 mM et concentrés tous deux à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Ils ont été injectés sur colonne de filtration sur gel de la même façon que les protéines sans la mutation C61S et l'élution a été analysée de la même façon.

*b) Dialyses successives, de conditions réductrices à oxydantes*

Certains échantillons, après l'étape de clivage protéolytique au facteur Xa, ont été utilisés directement, sans concentration, contre le tampon de destination, pour induire les ponts disulfures par dialyse, selon le protocole utilisé pour la cristallogénèse des mutants cystéine de VIH-1 p24 (Pornillos *et al.*, 2010). Brièvement, la première dialyse permet l'assemblage de la protéine par la forte salinité et de réduire les ponts disulfures formés au cours de la purification, qui ne sont pas nécessairement ceux attendus. La deuxième dialyse maintient la forte salinité pour conserver l'assemblage mais l'absence d'agent réducteur rend possible la formation des ponts disulfures, dans l'objectif de former les ponts disulfures stabilisateurs. La dernière permet de retirer l'excès de salinité. Trois tampons ont été utilisés :

- NaP<sub>i</sub> 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M, β-mercaptoéthanol 200 mM
- HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M, β-mercaptoéthanol 200 mM
- Tris-base 50 mM pH 8, NaCl 1 M, β-mercaptoéthanol 200 mM

Les échantillons ont été dialysés sur la nuit contre l'un de ces tampons. Le lendemain, les boudins de dialyse ont été transférés dans un tampon contenant le même couple de tampon pH, NaCl 1 M, sans β-mercaptoéthanol. La dialyse a été réalisée sur la journée pendant 8h. Les boudins de dialyse ont ultimement été transférés dans le tampon à même couple de tampon pH, NaCl 50 mM. Le lendemain, le contenu des boudins de dialyse a été récupéré, concentré sur Vivaspin 20 à des concentrations entre 1 et 30 mg.mL<sup>-1</sup> pour des essais de cristallogénèse.

Des échantillons de p24 ΔCPT ATC ont ainsi été produits :

- Un échantillon à 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon Tris-base pH 8 50 mM, NaCl 50 mM
- Un échantillon à 6 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon HEPES pH 6,8 50 mM, NaCl 50 mM
- Un échantillon à 30 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon Tris-base pH 8 50 mM, NaCl 300 mM

## 2. Détermination des ponts disulfures par la spectrométrie de masse

Les fractions d'éluion de la chromatographie d'exclusion de taille (voir V.H.1.a)), pour chacun des échantillons p24 ΔCPT A41C/T53C et p24 ΔCPT A13C/A44C ont été déposées sur gel non réducteur. Après migration, le gel non réducteur a été envoyé au service de spectrométrie de masse pour analyse par spectrométrie de masse des différentes bandes d'intérêt.

Cette analyse a été réalisée par la plateforme *Protein Science Facility* à l'IBCP (PSF, <https://www.sfr-biosciences.fr/plateformes/protein-sciences>), membre de la SFR BioSciences (UAR 3444/US8). Les bandes d'intérêt du gel ont été découpées pour en extraire les protéines. Une partie de l'extrait a été traité à un agent réducteur et

l'autre non ; les cystéines libres ont été alkylées pour protéger les groupements thiols libres pendant le reste de l'analyse. Les protéines ont été digérées à la chymotrypsine sur la nuit, puis dessalées sur colonne C18.

Les extraits ont été analysés sur spectromètre Q Exactive HF (Thermo Scientific), suivant un gradient de 60 min en mode DDA TOP20 HCD, et les 20 ions les plus intenses ont été sélectionnés pour une analyse par spectrométrie de masse en tandem.

Les fichiers de données ont été traités avec Proteom Discover v2.2, avec le moteur de recherche SEQUEST HT avec Carbamidomethyl (C) et Oxydation (M) comme modifications potentielles, en se restreignant à la séquence de la protéine p24  $\Delta$ CPT A41C/T53C. Les ponts disulfures ont été recherchés par les logiciels pLink v2.3.5, MeroX v2.0.0.4 et BioPharmaFinder v3.1.

## I. Criblage et caractérisation des ligands ciblant p24

### 1. Préparation des ligands

Les ligands fournis par nos collègues uruguayens sont issus d'une chimiothèque contenant plus de 2 000 molécules (Álvarez *et al.*, 2014) Plus de 400 ligands ont été criblés pour leur action sur l'assemblage de FIV p24 (Sierra *et al.*, 2018). Les échantillons en poudre ont été dissous dans le DMSO. Les ligands qui devaient être testés uniquement en test d'assemblage *in vitro* ont été dissous en DMSO standard, et ceux que nous souhaitions analyser *via* la RMN, en DMSO deutéré (DMSO- $d_6$ ), tous deux fournis par Sigma-Aldrich, chaque composé à la concentration finale de 25 mM sauf 696 préparé à 20 mM.

Les peptides ont été synthétisés par la plateforme PSF, qui a réalisé la synthèse et le contrôle qualité de la synthèse. Les peptides nous ont été fournis lyophilisés et nous les avons dissous dans de l'eau ultrapure (OTEC), à des concentrations finales de 1 mM ou 5 mM. La poudre a été conservée à 4°C et les peptides dissous à -80°C. Le calcul des concentrations a été réalisé à partir des masses molaires données par la plateforme PSF après synthèse.

- fCPSF6 : séquence PVLFPGQPFQGP, 1282 g.mol<sup>-1</sup>
- fNup153 : séquence NPSGVFTFG, 924 g.mol<sup>-1</sup>

### 2. Expériences de biophysique sur la protéine et ses ligands

#### a) Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire sur la protéine p24  $\Delta$ CPT ATC ont été acquis selon le protocole suivant. La protéine a été préparée dans un tampon NaPi 50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM à 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> et diluée extemporanément avec de l'eau pure à un ratio 1:4 pour une concentration finale de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de protéine, 10 mM NaPi et 10 mM NaCl dans la cuve. La cuve utilisée est une cuve en quartz d'un trajet optique de 1 mm.

Les spectres ont été acquis sur un spectromètre CD Chirascan (Applied Photophysics), sur un intervalle de longueurs d'onde de 260 nm à 180 nm par pas de 0,2 nm. Un spectre acquis contre le même tampon, dans une même cuve, dans les mêmes conditions, a servi de blanc et son signal a été retranché au signal acquis avec la protéine.

Après acquisition, le spectre a été tronqué lorsque le signal était arrivé à saturation, vers 190 nm. Le spectre a ensuite été moyenné sur un intervalle glissant de 1 nm (5 points). Le signal a été converti en ellipticité molaire par résidu (*mean residue ellipticity*, MRE) par le logiciel du fournisseur de la machine.

Le signal a été déconvolué par le service DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, (Whitmore et Wallace, 2008)) en utilisant l'algorithme SELCON3 avec le jeu de références « Set 4 » et en fournissant le spectre exprimé en MRE.

### b) *Interaction protéine:ligand par thermophorèse*

La titration de la protéine par le ligand par thermophorèse a été réalisée selon le protocole du fournisseur (NanoTemper Technologies).

#### (i) *Principe de la thermophorèse*

La thermophorèse à échelle microscopique ou MST (MicroScale Thermophoresis) est une méthode qui permet de quantifier les interactions biomoléculaires entre une cible marquée fluorescente et un ligand non fluorescent dans un capillaire. Elle détecte les changements de fluorescence induits par un changement de température de 1°C au centre du capillaire, qui entraîne un gradient thermique responsable d'un mouvement des molécules vers les zones de température plus faibles aux extrémités du capillaire. Tout changement du microenvironnement chimique ou de la masse de la molécule marquée, ainsi que les changements dans la coquille d'hydratation de la cible, liés à l'interaction avec un ligand, entraîneront une modification du mouvement des molécules dans le gradient thermique, et donc un changement relatif de la fluorescence détectée au point le plus chaud du capillaire.

Lorsque la protéine est saturée en ligand, le profil n'est plus modifié par l'augmentation croissante de la concentration en ligand. La technique permet d'une part de tester des interactions par simple comparaison du signal de la protéine marquée seule avec le signal de la protéine en interaction avec une forte concentration en ligand, et d'autre part de mesurer une valeur d'interaction  $K_D$  par titration en testant seize concentrations différentes (issues d'une dilution sérielle d'un facteur 2) (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014 ; Seidel *et al.*, 2013).

#### (ii) *Marquage de la protéine au fluorophore*

Un aliquot de protéine p24  $\Delta$ CPT à 1 mg.mL<sup>-1</sup> et un aliquot de p24E à la même concentration, portant toujours leur étiquette poly-histidine, ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Chaque aliquot a été décongelé pour être marqué avec le marqueur fluorescent RED-tris-NTA (NanoTemper Technologies) selon le protocole du fournisseur pour une concentration finale de protéine de 100 nM en

tampon PBS-T (Tween 0,1 %) 1X. Pour chaque protéine, le lot marqué a été utilisé immédiatement après marquage ou congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la prochaine utilisation du lot.

### (iii) Analyse des ligands

Les solutions de molécules organiques de nos collègues uruguayens, **696**, **1128**, **1138**, **1283**, **1310** et **1368** sont préparées depuis la solution mère à 25 mM ou 20 mM (cas de **696**) dans le DMSO. La concentration initiale pour les titrations a été calculée pour ne pas dépasser 5 % de DMSO dans la solution finale selon les recommandations du fournisseur de l'appareil de thermophorèse. Pour réaliser une titration, un mélange de protéine marquée à 100 nM et de ligand à volume équivalent (10  $\mu\text{L}$  + 10  $\mu\text{L}$ ) a été réalisé pour charger les capillaires (Monolith NT.115 Capillaries, NanoTemper) selon le protocole suivant. Une solution de chaque ligand organique a été préparée depuis la solution mère en diluant le ligand dans le tampon PBS-T 1X pour une concentration finale de 2 mM (cas de **696**) ou 2,5 mM (autres ligands), PBS-T 1X, DMSO 10 %. Les dilutions sérielles d'un facteur 2 du ligand sont effectuées dans un tampon PBS-T 1X, DMSO 10 % pour garder la concentration en DMSO constante sur l'ensemble de la gamme de dilution. La dilution sérielle a été réalisée en transférant 10  $\mu\text{L}$  du puits  $i$  dans le puits  $i+1$  contenant 10  $\mu\text{L}$  de PBS-T, DMSO 10 %. Enfin, les puits ont été complétés par 10  $\mu\text{L}$  de la solution protéique, amenant à des puits à une concentration de 50 nM de protéine, DMSO 5 % et des concentrations en ligand de 1 mM à 0,31  $\mu\text{M}$  (**696**) ou de 1,25 mM à 38  $\mu\text{M}$  (**1128**, **1138**, **1283**, **1310** et **1368**). Les solutions de protéines et ligands ont été laissés 30 min à température ambiante dans leurs puits avant de charger les capillaires afin d'effectuer la mesure à l'équilibre. Les profils MST de chaque capillaire ont été analysés par la machine Monolith NT.115 (NanoTemper). La puissance d'excitation laser était de 40 % et la température de l'ensemble thermostatée à  $25^{\circ}\text{C}$ . Les données ont été traitées *via* les logiciels du fournisseur (MO.Control 2 et MO.Affinity Analysis 3).

Les peptides ont été analysés depuis les solutions stocks à  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , dans l'eau pure. L'absence de DMSO dans le tampon enlève la contrainte de dilution des peptides pour le premier point de la titration. L'analyse de la fixation de chaque peptide a été réalisée en comparant quatre capillaires ne contenant que la protéine seule à une concentration de 50 nM issue en tampon PBS-T 1X ou un mélange au ratio 1:1 (*v:v*) de la solution protéique et de la solution peptidique mère, soit une concentration finale en ligand de  $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Le chargement des capillaires et l'acquisition des profils MST ont été acquis de façon similaire à précédemment décrit pour les ligands organiques.

Pour la titration de l'interaction CPSF6:p24, les seize solutions ont été préparées par dilution sérielle en transférant 10  $\mu\text{L}$  de la solution peptidique du puits  $i$  au puits  $+1$  contenant 10  $\mu\text{L}$  de tampon PBS-T, depuis la solution mère à  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### c) Interaction protéine:ligand par calorimétrie isotherme

La titration par calorimétrie isotherme mesure la puissance électrique à fournir pour maintenir une solution à une température constante. Une enceinte de

référence contient de l'eau pure, tandis que l'enceinte de mesure renferme la solution protéique, dans le tampon adéquat. Chacune des deux est équipée d'une cellule de résistance dont la puissance fournie pour maintenir l'enceinte à la température de consigne est mesurée. Une sonde, contenant une solution de ligand dans le même tampon que la solution protéique, est introduite dans l'enceinte. Elle injecte son contenu dans la cellule en plusieurs passes, séparées d'un temps suffisamment long pour atteindre l'équilibration du mélange. La sonde est maintenue sous agitation pour homogénéiser la solution. L'interaction protéine:ligand consomme ou crée de la chaleur et la différence de puissance nécessaire entre les deux cellules pour revenir à la température de consigne constitue le signal mesuré. Le logiciel calcule ensuite la variation d'énergie associée aux variations du ratio molaire protéine:ligand et en déduit les grandeurs thermodynamiques de l'interaction.

La calorimétrie isotherme a été réalisée à l'aide d'un appareil de calorimétrie différentielle ITC200 (MicroCal). La sonde injecte un volume total d'environ 38  $\mu\text{L}$  en 25 injections dans un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . L'enceinte externe contenait de l'eau pure. La sonde était maintenue à une rotation de 1 000 rpm pour homogénéisation et en laissant 120 s entre deux injections. L'ensemble de l'enceinte était maintenu à 25°C.

Puisque les expériences préalables donnaient un ordre de grandeur de constante de dissociation  $K_D$  entre 10 et 100  $\mu\text{M}$ , la concentration de ligand ciblée était de 200  $\mu\text{M}$  pour correspondre aux recommandations du fournisseur. Le ligand était donc dilué à 200  $\mu\text{M}$  (1 % DMSO final depuis la solution stock 20 mM en 100 % DMSO), avec du tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM. La protéine p24  $\Delta\text{CPT}$ , sans étiquette, était à une concentration de 30  $\mu\text{M}$  (0,7  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), dans le même tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM, DMSO 1 %.

### 3. Analyse de l'action du ligand sur l'assemblage *in vitro*

#### a) Tests d'assemblage de la protéine

Les tests d'assemblage ont été réalisés sur les protéines p24  $\Delta\text{CPT}$  et p24E. Ces protéines ont été préparées dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, à 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  et à 7  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'assemblage a été déclenché par un saut de force ionique selon le protocole publié préalablement (Sierra *et al.*, 2018). Dans une plaque 96 puits, un volume de 25  $\mu\text{L}$  de solution protéique préalablement incubée ou non avec **696** à 200  $\mu\text{M}$  a été mélangé à 25  $\mu\text{L}$  de NaCl 1 M. L'assemblage a été suivi par spectrophotométrie par des mesures de la turbidité du mélange à 345 nm toutes les minutes pendant 35 min dans lecteur de plaques M1000 (Tecan). La plaque était maintenue à 38°C pendant la durée de l'expérience.

#### b) Tests de désassemblage de la capsid

Les particules formées à l'issue du test d'assemblage, en présence ou non de **696**, ont été collectées. Les particules ont été sédimentées par centrifugation à 20 000  $\times$  g pendant 20 min à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et

les particules ont été resuspendues dans un tampon  $\text{NaP}_i$  pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM. Des aliquots ont été prélevés immédiatement ( $t_0$ ), 8h, 24h ou 32h après resuspension. Les aliquots ont été analysés sur SDS-PAGE 12 % et les gels ont été colorés comme précédemment.

## J. Cristallographie

Les échantillons utilisés pour la cristallographie sont principalement des échantillons produits en tampon HEPES ou Tris 50 mM, à des pH différents, le tampon phosphate ayant tendance à cristalliser en présence de cations divalents.

### 1. Cristallogenèse en micropuits

La concentration des échantillons produits a été vérifiée sur Nanodrop avant utilisation. Les expériences de cristallogenèse en micropuits ont été réalisées sur des échantillons avant leur congélation, juste après l'étape finale de concentration sur Vivaspin après le clivage de l'étiquette pour les protéines à étiquette clivable, ou juste après le dessalage post-purification pour les protéines p24-pET $\Delta$ CPM.

Les expériences de cristallogenèse ont été réalisées *via* un robot Mosquito (TTP LabTech). La robotisation permet de tester de nombreuses conditions en utilisant un volume minimal d'échantillon de protéine avec une très bonne reproductibilité. La cristallogenèse a été réalisée par diffusion de la vapeur en goutte assise en plaque MRC 3 puits (Hampton Research), en déposant 70  $\mu\text{L}$  de solution de cristallogenèse dans le puits principal. Le robot a réalisé des gouttes de mélange de 150 nL de solution protéique avec 150 nL de solution de cristallogenèse. Les expériences de cristallogenèse ont été réalisées sur différents lots protéiques, dans les différents tampons de stockage cités dans la partie V.D page 153, à des concentrations de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  à 100  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Les solutions de cristallogenèse utilisées sont contenues dans des kits commerciaux de criblage :

- PEG I (Qiagen)
- PEG II (Qiagen)
- Crystal Screen (Hampton Research)
- Ammonium sulfate (Hampton Research)
- MBClass II (NeXtal Biotech)
- MIDAS+ (Protomnis)
- Natrix (Hampton Research)
- BCS (Protomnis)
- JCSG+ (NeXtal Biotech)
- Pact I (Protomnis)

- MPD (Qiagen)

Les boîtes, une fois préparées par le robot, sont scellées par un film plastique hermétique et placées dans un robot de visualisation Xtal Focus (Formulatrix), à 19°C, acquérant les images sur plusieurs semaines pour suivre l'apparition de cristaux dans les différentes conditions.

## 2. Cristallogenèse en gouttes suspendues

Les conditions de cristallogenèse ayant présenté des évolutions intéressantes pour la cristallogenèse ont été reproduites en plus grosses gouttes, dans des plaques 24 puits à couvercle pré-graissé (Greiner) avec la technique de la goutte suspendue. Le puits contient 500  $\mu\text{L}$  de solution de cristallogenèse et la goutte de cristallogenèse est formée par le mélange de 1  $\mu\text{L}$  de solution protéique et 1  $\mu\text{L}$  de solution de cristallogenèse, sur une lamelle en verre siliconée qui sert à sceller le puits pré-graissé. Les conditions testées en gouttes suspendues sont :

- PEG II conditions 27, 28, 80, 87, 88, 92, 93, 94, 95 et 96 – p24E A41C/T53C 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  et 7  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans le tampon HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM.
- PEG I conditions 28, 73, 79 - p24E A41C/T53C 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  et 7  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans le même tampon.
- MBClass II condition 3 – p24-pET $\Delta$ CPM 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans le tampon HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM.
- PEG II conditions 56, 80, 92, 93 – p24  $\Delta$ CPT 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ , et p24  $\Delta$ CPT 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans le tampon HEPES pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM et **696** à 200  $\mu\text{M}$

## 3. Préparation des cristaux et acquisition des données de diffraction

Les cristaux ont été pêchés à l'aide de boucles en nylon et ont été cryo-protégés par trempage dans un mélange 85 % de la solution de cristallogenèse et 15 % d'éthylène glycol. Une fois cryo-protégés, ils ont été congelés dans l'azote liquide et placés dans un carrousel pour l'envoi aux synchrotrons.

Les synchrotrons auxquels nous avons envoyé les échantillons au cours du travail de thèse sont le synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France), le synchrotron SLS (Villigen, Suisse) et le synchrotron ESRF (Grenoble, France). Quatre clichés de diffraction à des angles différents ont été acquis pour caractériser l'assemblage cristallin. Comme les cristaux étaient soit des cristaux de sels, soit ne diffractaient pas les rayons X, aucune collecte complète n'a été réalisée.

## K. Acquisition et traitements des spectres RMN

### 1. La résonance magnétique nucléaire appliquée aux protéines

#### a) *La RMN multi-dimensionnelle*

La RMN multi-dimensionnelle est une technique d'acquisition et de traitement des signaux de plusieurs noyaux s'ils vérifient certaines conditions, à savoir s'ils sont proches dans l'espace ou s'ils sont reliés au travers des liaisons covalentes. La fréquence de couplage des atomes impliqués pouvant être détectée spécifiquement selon les liaisons covalentes concernées, nous avons utilisé des séquences d'impulsion adaptées pour l'acquisition de signaux d'atomes reliés par des liaisons covalentes pour nos expériences d'attribution.

#### b) *L'attribution de la protéine p24*

Le logiciel CCPN analysis v2.5 (Vranken *et al.*, 2005) a permis d'identifier les pics sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, donnant ainsi les déplacements chimiques de chaque couple N-H du squelette peptidique. Ces pics ont servi de points d'entrée dans l'exploration des spectres 3D, voir la partie V.K.2. L'attribution séquentielle a ainsi été faite selon la description faite dans la partie V.K.2, par comparaison des informations apportées par chaque spectre.

La qualité de l'attribution a été complétée par un spectre HNCANNH faisant apparaître des corrélations de résonance entre le  $\text{H}_\text{N}$  de l'acide aminé  $i$  avec le N du squelette peptidique de l'acide aminé  $i-1$  et du  $i+1$ . Le serveur *I-Pine* a également été utilisé pour traiter les données et aider à l'attribution (Lee *et al.*, 2019).

Enfin, nous avons effectué une validation de notre attribution en comparant les différences de déplacements chimiques observées des  $\text{C}_\alpha$  et  $\text{C}_\beta$  pour les résidus attribués aux valeurs de référence de déplacements de ces mêmes carbones dans une pelote statistique. Ces différences de déplacements ont été quantifiées par le logiciel CCPN analysis. Les différences négatives correspondent à un repliement en brin  $\beta$  et les différences positives à un repliement en hélice  $\alpha$ . Ces différences ont été comparées à la structure tridimensionnelle publiée de FIV p24 (entrée PDB 5NA2, (Folio *et al.*, 2017)). L'attribution a été déposée après validation du fichier sur la BMRB sous l'identifiant 50794.

### 2. Le processus d'attribution séquentielle des pics

La RMN multidimensionnelle permet d'observer les résonances de pics  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  qu'il faut ensuite attribuer à l'atome correspondant au sein de la molécule. Cette étape est appelée attribution. Il faut pour chaque pic de résonance, déterminer au noyau de quel atome de la protéine il correspond. Pour réaliser une attribution, il est donc nécessaire d'utiliser plusieurs expériences RMN qui vont donner différentes informations :

- Les expériences  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Hetero Single Quantum Correlation (HSQC), qui permettent de voir tous les couples  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  reliées par liaison covalente, à savoir les N-H de la liaison peptidique et ceux des chaînes radicalaires.
- Les expériences HNCO, qui mettent en évidence tous les triplets H-N-C du squelette peptidique de la chaîne, entre le couple N-H l'acide aminé  $i$  et le carbone de l'acide aminé  $i-1$ .
- Les expériences HN(CA)CO qui mettent en évidence les triplets H-N-C du squelette peptidique, de l'acide aminé  $i$ .
- Les expériences HNCA, qui mettent en évidence les  $\text{C}_\alpha$  des radicaux des acides aminés  $i$  et  $i-1$  avec le N-H de l'acide aminé  $i$ .
- Les expériences HN(CO)CA, qui mettent en évidence le  $\text{C}_\alpha$  du radical de l'acide aminé  $i-1$  avec le N-H de l'acide aminé  $i$ .
- Les expériences HNCACB, qui mettent en évidence les  $\text{C}_\alpha$  et les  $\text{C}_\beta$  des radicaux des acides aminés  $i$  et  $i-1$  avec le N-H de l'acide aminé  $i$ . Les deux carbones ont des signaux de signe opposé qui permettent de les différencier.
- Les expériences HN(CO)CACB, qui mettent en évidence les  $\text{C}_\alpha$  et les  $\text{C}_\beta$  du radical de l'acide aminé  $i-1$  avec le N-H de l'acide aminé  $i$ . De la même façon, les deux carbones ont des signaux de signe opposé qui permet de les différencier.
- Les expériences HNCANNH, qui mettent en évidence les N de la liaison amide de l'acide aminé  $i-1$  et  $i+1$  avec le N-H de l'acide aminé  $i$ .

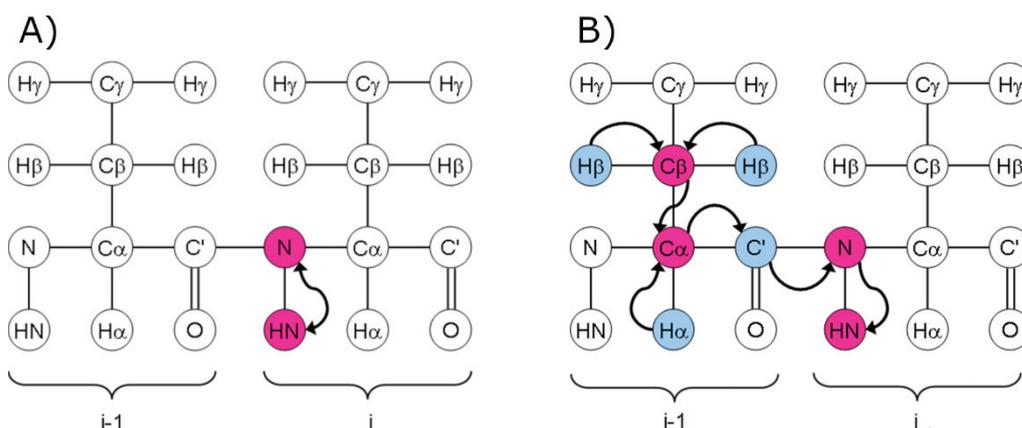


Figure 83 : Exemples de spectres RMN utilisés pour l'attribution. A) Noyaux visibles sur un spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. La magnétisation est transférée de l'hydrogène à l'azote, puis à l'hydrogène pour détection. B) Noyaux visibles sur spectre CBCA(CO)NH. Les magnétisations sont transférées depuis les hydrogènes  $\text{H}_\beta$  et  $\text{H}_\alpha$  vers le carbone  $\text{C}_\beta$  et  $\text{C}_\alpha$  respectivement, puis au carbone de la liaison amide, puis à l'azote puis à l'hydrogène. En rouge : noyaux visibles sur le spectre ; en bleu : noyaux impliqués dans le transfert de magnétisation, n'apparaissant pas sur le spectre. (Figure d'après protein-nmr.org.uk).

La combinaison des informations apportées par les différents spectres RMN permet de reconstruire les chaînes d'acides aminés en identifiant séquentiellement, pour un acide aminé  $i$ , les C de la liaison amide, ainsi que les  $C_\alpha$  et  $C_\beta$  de l'acide aminé  $i-1$ . On peut ainsi reconstruire des chaînes séquentielles d'acides aminés. Le déplacement chimique moyen des noyaux des acides aminés est connu et accessible, fournissant une base de données pour faciliter l'attribution d'un ensemble de pics à un type d'acide aminé. Certains acides aminés ont des déplacements très caractéristiques, comme la glycine dont le  $C_\alpha$  a un déplacement vers 45 ppm, l'alanine dont le  $C_\beta$  vers 17 ppm et la sérine et la thréonine dont le  $C_\beta$  entre 70 et 63 ppm. Ces acides aminés sont les seuls à avoir ces propriétés, ce qui permet de positionner les chaînes séquentielles reconstituées sur la séquence peptidique qui est déjà connue, et de pouvoir attribuer ainsi chaque signal RMN au noyau atomique du résidu correspondant dans la séquence protéique.

Une fois validée, l'attribution des noyaux est ensuite déposée sur la *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB) qui vérifie les valeurs de déplacements en comparant avec les valeurs de référence et examine ainsi la plausibilité de l'attribution.

### 3. Acquisition des spectres

Tous les échantillons ont été analysés au centre de RMN à hauts champ du TGIR-RMN de l'université de Lille et chargés dans des tubes Shigemi de 5 mm. Les spectres ont été acquis dans un spectromètre RMN Bruker AvanceNeo à 900 MHz équipé d'une cryosonde CPTCI, à 293 K.

Les premiers spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC ont été acquis sur une protéine marquée simplement au  $^{15}\text{N}$ , ajustée à une concentration de  $1,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $67 \mu\text{M}$ ), dans un tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM,  $\text{D}_2\text{O}$  5 %, à l'aide d'une séquence d'impulsions 2D TROSY  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

Pour les protéines doublement marquées au  $^{13}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$ , les échantillons ont été stockés dans le même tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8,  $\text{NaCl}$  50 mM,  $\text{D}_2\text{O}$  5 %, à une concentration de  $2,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{M}$ ). Les spectres ont été acquis à l'aide des séquences d'impulsions 2D TROSY  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , et 3D BEST-TROSY HNCO, BEST-TROSY-HN(CA)CO, BEST-TROSY-HNCACB, BEST-TROSY-HN(CO)CACB, BEST-TROSY-HNCA et BEST-TROSY-HNCOCA. (Bax et Ikura, 1991 ; Clubb, Thanabal et Wagner, 1992 ; Grzesiek et Bax, 1992).

Les échantillons triplement marqués au deutérium D, au  $^{13}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$ , étaient à une concentration de  $2,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) ou de  $2,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $120 \mu\text{M}$ ) dans un tampon complété par le DTT à 5mM de concentration finale. Les spectres ont été acquis à l'aide des mêmes séquences d'impulsions 2D TROSY  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , et 3D BEST-TROSY HNCO, BEST-TROSY-HN(CA)CO, BEST-TROSY-HNCACB, BEST-TROSY-HN(CO)CACB, BEST-TROSY-HNCA, BEST-TROSY-HNCOCA et d'une autre séquence, TROSY-HNCANNH, pour aider à l'attribution. Ces séquences d'impulsion permettent d'obtenir les spectres RMN associés.

L'attribution de la protéine FIV p24  $\Delta$ CPT a été réalisée à l'aide de ces spectres, via le logiciel CCPN analysis v2.5, puis a été déposée sur la BRMB sous l'identifiant 50794.

Pour l'expérience de *Saturation Transfer Difference*, les spectres 1D- $^1\text{H}$  ont été acquis sur des échantillons de protéine non marquée, dans des tampons deutérés. Le signal du composé **696** a été acquis dans le DMSO- $\text{d}_6$  pur (400  $\mu\text{M}$  final) ou dans une dilution par le tampon  $\text{NaP}_i$  pH 6,8 50 mM, NaCl 50 mM,  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8 %), DMSO- $\text{d}_6$  4 % (pour une concentration finale de 400  $\mu\text{M}$ ).

Pour toutes les acquisitions, la référence utilisée pour les déplacements chimiques du proton était le signal des groupements méthyl du TMSP (sodium 3-trimethylsilyl-[2,2,3,3- $\text{d}_4$ ]propionate) à 0 ppm. Les données ont été traitées via les logiciels NMRPipe (Mayzel *et al.*, 2014) par nos collègues de l'université de Lille. Les spectres ont ensuite été traités via la suite logicielle CCPN analysis v2.5 (Vranken *et al.*, 2005).

#### 4. Suivi des perturbations des déplacements chimiques induits par l'ajout de ligand

La fixation d'un ligand peut induire des réajustements structuraux, par déplacements des radicaux des acides aminés impliqués dans la fixation ou via des déplacements de boucles flexibles ou de structures secondaires. Ainsi, puisque le déplacement chimique d'un noyau dépend de l'environnement de l'atome observé, la fixation d'un ligand peut modifier le déplacement chimique de cet atome. Les acides aminés dont la conformation est modifiée par la présence du ligand peuvent alors montrer des altérations de leur déplacement chimique que l'on peut quantifier avant et après ajout du ligand étudié. Si l'attribution a été préalablement réalisée, les acides aminés sont alors identifiés car la variation de leur déplacement chimique est supérieure au bruit de fond. On détermine la variation de déplacement chimique de chaque résidu. On identifie alors les acides aminés qui ont une perturbation supérieure au bruit de fond.

Le suivi des perturbations de déplacements chimiques a été fait sur des échantillons de protéine marquée au  $^{15}\text{N}$ , ajustée à une concentration de 2,2  $\text{mg.mL}^{-1}$  (90  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon  $\text{NaP}_i$  50 mM pH 6,8, NaCl 50 mM,  $\text{D}_2\text{O}$  5 %. Les spectres ont été acquis en présence ou non de **696** à une concentration de 200  $\mu\text{M}$ . Nous avons ajouté le volume nécessaire de **696** (depuis une solution stock à 20 mM dans le DMSO), soit 3,3  $\mu\text{L}$  de solution stock dans un volume d'échantillon de 330  $\mu\text{L}$  pour atteindre 200  $\mu\text{M}$  de **696** dans l'échantillon (DMSO final 1 %). Les spectres témoins ont été acquis en ajoutant le même volume de DMSO pur à un autre échantillon protéique.

Les perturbations de déplacements chimiques de chaque acide aminé attribué (*chemical shift perturbations, CSP*) ont été quantifiées sur les deux dimensions  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ . Nous avons comparé les signaux de l'azote et de l'hydrogène du squelette peptidique de chaque acide aminé, en présence ou non du composé **696**, en tenant

compte du ratio des fenêtres spectrales du  $^1\text{H}$  et du  $^{15}\text{N}$ ,  $\omega_{\text{H}}$  et  $\omega_{\text{N}}$  de l'expérience, donnant

$$\text{CSP} = \sqrt{(\delta^{1\text{H}})^2 + \frac{\omega_{\text{N}}}{\omega_{\text{H}}} (\delta^{15\text{N}})^2} = \sqrt{(\delta^{1\text{H}})^2 + 0,237 \times (\delta^{15\text{N}})^2}$$

Les acides aminés dont les pics de déplacements chimiques se chevauchent ont dû être exclus de l'analyse, leurs perturbations ne pouvant être quantifiées rigoureusement à cause de cette superposition. Les perturbations des acides aminés retenus ont été quantifiées selon la formule précédente et les acides aminés ont été classés selon cette valeur de perturbation. L'écart-type de ces perturbations a été quantifié et la valeur de bruit de fond a été fixée à 3 fois cet écart-type. Nous avons analysé les acides aminés qui ressortaient du bruit de fond pour déterminer leurs positions dans la structure et avons retenu les premiers acides aminés présentant le rapport signal sur bruit le plus important.

## L. Logiciels de visualisation et d'analyse des structures et séquences

Les figures de structures moléculaires ont été générées par les logiciels UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) et PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Les rendus de surfaces moléculaires ont été représentés à l'aide de l'outil MSMS du logiciel Chimera.

L'alignement de séquence des différentes constructions protéiques a été réalisé avec le logiciel Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) et l'alignement des séquences et structures secondaires de FIV p24 et VIH-1 p24 avec le logiciel ENDscript (<https://endscript.ibcp.fr>).

## M. Modélisation moléculaire

Préalablement aux expériences de *docking* moléculaire du composé, la structure de la protéine a été préparée par AutoDockTools v1.5.6 (Morris *et al.*, 2009). Le logiciel a ajouté les hydrogènes polaires et a calculé les charges atomiques partielles de Gasteiger, avant de convertir la structure au format de fichier PDBQT

Le *docking* a été réalisée *via* AutoDock Vina v1.1.2 (Trott et Olson, 2010). Le composé **696**, également préparé par AutoDockTools, a été traité comme flexible et la protéine comme rigide, excepté les chaînes latérales des acides aminés situées dans la zone identifiée par les expériences de CSP comme intervenant dans la fixation, soit : Leu 30, Phe 39, Thr 49, Met 51, Ile 55, Met 56, Cys 61, Asp 64, Lys 65, Glu 66, Ile 67, Leu 68, Asp 69, Glu 70, Leu 72, Lys 73, Thr 76, Asp 80, Met 100, Ile 102, Cys 121, Tyr 125 et Leu 129. La modélisation a été réalisée selon le processus usuel du logiciel : la *grid box* a été paramétrée de manière à ce que l'espace de recherche englobe *a minima* la zone putative de fixation du ligand. Enfin, une valeur élevée d'exhaustivité de recherche (*exhaustiveness*) de 500 a été employée afin d'avoir une résolution de recherche la plus précise possible.

À l'issu de sa recherche, le logiciel a classé les poses d'interaction selon un critère de maximisation de l'énergie d'interaction et propose les dix meilleures positions possibles. L'examen visuel de ces dernières a été faite *via* le logiciel PyMOL (Schrödinger, LLC) et le modèle de fixation ayant la meilleure affinité protéine:ligand a été analysé par le programme LigPlot+ v2.2 (Laskowski et Swindells, 2011) pour identifier les acides aminés impliqués dans la fixation du composé dans le modèle retenu.



## VI. Bibliographie

---

Abilev S.K., Smirnova S.V., Igonina E.V., Parmon V.N., Yankovsky N.K. (2018). Deuterium Oxide Enhances Escherichia Coli SOS Response Induced by Genotoxicants, *Doklady Biological Sciences*, 480, vol 1, p. 85-89.

Affranchino J.L., González S.A. (2010). In Vitro Assembly of the Feline Immunodeficiency Virus Gag Polyprotein, *Virus Research*, 150, vol 1, p. 153-157.

Affranchino J.L., González S.A. (2014). Understanding the Process of Envelope Glycoprotein Incorporation into Virions in Simian and Feline Immunodeficiency Viruses, *Viruses*, 6, vol 1, p. 264-283.

Alvarez G., Pul L. van, Robert X., Artía Z., Nuenen A.C. van, Long M., Sierra N., Porcal W., Kootstra N.A., Guillon C. (s. d.). Identification of 2-(4-N,N-Dimethylaminophenyl)-5-methyl-1-phenethyl-1H-benzimidazole targeting HIV-1 CA capsid protein and in-hibiting HIV-1 replication in cellulo, *Journal of Medicinal Chemistry*, p. submitted.

Álvarez G., Varela J., Márquez P., Gabay M., Arias Rivas C.E., Cuchilla K., Echeverría G.A., Piro O.E., Chorilli M., Leal S.M., Escobar P., Serna E., Torres S., Yaluff G., Vera de Bilbao N.I., González M., Cerecetto H. (2014). Optimization of Antitrypanosomatid Agents: Identification of Nonmutagenic Drug Candidates with in Vivo Activity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, vol 10, p. 3984-3999.

Arhel N. (2010). Revisiting HIV-1 Uncoating, *Retrovirology*, 7, p. 96.

Bakir T.M. (2018). The Role of SAMHD1 Expression and Its Relation to HIV-2 (Vpx) Gene Production, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, vol 6, p. 903-908.

Balasubramaniam M., Zhou J., Addai A., Martinez P., Pandhare J., Aiken C., Dash C. (2019). PF74 Inhibits HIV-1 Integration by Altering the Composition of the Preintegration Complex, *Journal of Virology*, 93, vol 6, p. e01741-18.

Bangham C.R., Ratner L. (2015). How Does HTLV-1 Cause Adult T-Cell Leukaemia/Lymphoma (ATL)?, *Current opinion in virology*, 14, p. 93-100.

Barré-Sinoussi F. (1996). HIV as the Cause of AIDS, *The Lancet*, 348, vol 9019, p. 31-35.

Bax A., Ikura M. (1991). An Efficient 3D NMR Technique for Correlating the Proton And<sup>15</sup>N Backbone Amide Resonances with the  $\alpha$ -Carbon of the Preceding Residue in Uniformly<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C Enriched Proteins, *Journal of Biomolecular NMR*, 1, vol 1, p. 99-104.

Bayro M.J., Chen B., Yau W.-M., Tycko R. (2014). Site-Specific Structural Variations Accompanying Tubular Assembly of the HIV-1 Capsid Protein, *Journal of Molecular Biology*, 426, vol 5, p. 1109-1127.

- Bęczkowski P.M., Litster A., Lin T.L., Mellor D.J., Willett B.J., Hosie M.J. (2015). Contrasting Clinical Outcomes in Two Cohorts of Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus (FIV), *Veterinary Microbiology*, 176, vol 1-2, p. 50-60.
- Bester S.M., Wei G., Zhao H., Adu-Ampratwum D., Iqbal N., Courouble V.V., Francis A.C., Annamalai A.S., Singh P.K., Shkriabai N., Blerkom P.V., Morrison J., Poeschla E.M., Engelman A.N., Melikyan G.B., Griffin P.R., Fuchs J.R., Asturias F.J., Kvaratskhelia M. (2020). Structural and Mechanistic Bases for a Potent HIV-1 Capsid Inhibitor, *Science*, 370, vol 6514, p. 360-364.
- Bharat T.A.M., Menendez L.R.C., Hagen W.J.H., Lux V., Igonet S., Schorb M., Schur F.K.M., Kräusslich H.-G., Briggs J.A.G. (2014). Cryo-Electron Microscopy of Tubular Arrays of HIV-1 Gag Resolves Structures Essential for Immature Virus Assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, vol 22, p. 8233-8238.
- Bhattacharya A., Alam S.L., Fricke T., Zadrozny K., Sedzicki J., Taylor A.B., Demeler B., Pornillos O., Ganser-Pornillos B.K., Diaz-Griffero F., Ivanov D.N., Yeager M. (2014). Structural Basis of HIV-1 Capsid Recognition by PF74 and CPSF6, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, vol 52, p. 18625-18630.
- Bhunja A., Bhattacharjya S., Chatterjee S. (2012). Applications of Saturation Transfer Difference NMR in Biological Systems, *Drug Discovery Today*, 17, vol 9, p. 505-513.
- Blair W.S., Pickford C., Irving S.L., Brown D.G., Anderson M., Bazin R., Cao J., Ciaramella G., Isaacson J., Jackson L., Hunt R., Kjerrstrom A., Nieman J.A., Patick A.K., Perros M., Scott A.D., Whitby K., Wu H., Butler S.L. (2010). HIV Capsid Is a Tractable Target for Small Molecule Therapeutic Intervention, *PLoS Pathogens*, 6, vol 12, p. e1001220.
- Bocanegra R., Nevot M., Doménech R., López I., Abián O., Rodríguez-Huete A., Cavasotto C.N., Velázquez-Campoy A., Gómez J., Martínez M.Á., Neira J.L., Mateu M.G. (2011). Rationally Designed Interfacial Peptides Are Efficient In Vitro Inhibitors of HIV-1 Capsid Assembly with Antiviral Activity, *PLoS One*, 6, vol 9.
- Bönisch I.Z., Dirix L., Lemmens V., Borrenberghs D., Wit F.D., Vernailen F., Rocha S., Christ F., Hendrix J., Hofkens J., Debyser Z. (2020). Capsid Labelled HIV to Investigate the Role of Capsid during Nuclear Import and Integration, *Journal of Virology*, 94, vol 7, p. e01024-19.
- Briggs J. a. G., Riches J.D., Glass B., Bartonova V., Zanetti G., Kräusslich H.-G. (2009). Structure and Assembly of Immature HIV, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, vol 27, p. 11090-11095.
- Briggs J.A.G., Simon M.N., Gross I., Kräusslich H.-G., Fuller S.D., Vogt V.M., Johnson M.C. (2004). The Stoichiometry of Gag Protein in HIV-1, *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, vol 7, p. 672-675.
- Brown L.A., Cox C., Baptiste J., Summers H., Button R., Bahlow K., Spurrier V., Kyser J., Luttge B.G., Kuo L., Freed E.O., Summers M.F. (2015). NMR Structure of the

Myristylated Feline Immunodeficiency Virus Matrix Protein, *Viruses*, 7, vol 5, p. 2210-2229.

Brown M.A., Munkhtsog B., Troyer J.L., Ross S., Sellers R., Fine A.E., Swanson W.F., Roelke M.E., O'Brien S.J. (2010). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) in Wild Pallas' Cats, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134, vol 1-2, p. 90-95.

Buffone C., Martinez-Lopez A., Fricke T., Opp S., Severgnini M., Cifola I., Petiti L., Frabetti S., Skorupka K., Zadrozny K.K., Ganser-Pornillos B.K., Pornillos O., Di Nunzio F., Diaz-Griffero F. (2018). Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells, *Journal of Virology*, 92, vol 19, p. e00648-18.

Burdick R.C., Li C., Munshi M., Rawson J.M.O., Nagashima K., Hu W.-S., Pathak V.K. (2020). HIV-1 Uncoats in the Nucleus near Sites of Integration, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, vol 10, p. 5486-5493.

Campbell E.M., Hope T.J. (2015). HIV-1 Capsid: The Multifaceted Key Player in HIV-1 infection, *Nature reviews. Microbiology*, 13, vol 8, p. 471-483.

Carlson L.-A., Briggs J.A.G., Glass B., Riches J.D., Simon M.N., Johnson M.C., Müller B., Grünewald K., Kräusslich H.-G. (2008). Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis, *Cell Host & Microbe*, 4, vol 6, p. 592-599.

Carlson L.-A., Marco A. de, Oberwinkler H., Habermann A., Briggs J.A.G., Kräusslich H.-G., Grünewald K. (2010). Cryo Electron Tomography of Native HIV-1 Budding Sites, *PLoS Pathogens*, 6, vol 11, p. e1001173.

Carnes S.K., Zhou J., Aiken C. (2018). HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus, *Journal of Virology*, 92, vol 20, p. e00358-18.

Cavalcante L.T.F., Muniz C.P., Jia H., Augusto A.M., Troccoli F., Medeiros S. de O., Dias C.G.A., Switzer W.M., Soares M.A., Santos A.F. (2018). Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats, *Viruses*, 10, vol 12, p. 702.

Chen X., Coric P., Larue V., Turcaud S., Wang X., Nonin-Lecomte S., Bouaziz S. (2020). The HIV-1 Maturation Inhibitor, EP39, Interferes with the Dynamic Helix-Coil Equilibrium of the CA-SP1 Junction of Gag, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, p. 112634.

Chin C.R., Perreira J.M., Savidis G., Portmann J.M., Aker A.M., Feeley E.M., Smith M.C., Brass A.L. (2015). Direct Visualization of HIV-1 Replication Intermediates Shows That Capsid and CPSF6 Modulate HIV-1 Intra-Nuclear Invasion and Integration, *Cell Reports*, 13, vol 8, p. 1717-1731.

- Chukkapalli V., Ono A. (2011). Molecular Determinants That Regulate Plasma Membrane Association of HIV-1 Gag, *Journal of Molecular Biology*, 410, vol 4, p. 512-524.
- Clubb R.T., Thanabal V., Wagner G. (1992). A Constant-Time Three-Dimensional Triple-Resonance Pulse Scheme to Correlate Intraresidue <sup>1</sup>HN, <sup>15</sup>N, and <sup>13</sup>C' Chemical Shifts in <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-Labelled Proteins, *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 97, vol 1, p. 213-217.
- Coleman J.K., Pu R., Martin M.M., Noon-Song E.N., Zwijnenberg R., Yamamoto J.K. (2014). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Vaccine Efficacy and FIV Neutralizing Antibodies, *Vaccine*, 32, vol 6, p. 746-754.
- Cosnefroy O., Murray P.J., Bishop K.N. (2016). HIV-1 Capsid Uncoating Initiates after the First Strand Transfer of Reverse Transcription, *Retrovirology*, 13, vol 1, p. 1-17.
- Cowley D.J., Mackin R.B. (1997). Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human Proinsulin, *FEBS Letters*, 402, vol 2-3, p. 124-130.
- Cullen B.R. (1991). Regulation of HIV-1 Gene Expression, *The FASEB Journal*, 5, vol 10, p. 2361-2368.
- Danielson C.M., Hope T.J. (2013). Using Antiubiquitin Antibodies to Probe the Ubiquitination State Within rhTRIM5 $\alpha$  Cytoplasmic Bodies, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29, vol 10, p. 1373-1385.
- Dharan A., Bachmann N., Talley S., Zwickelmaier V., Campbell E.M. (2020). Nuclear Pore Blockade Reveals That HIV-1 Completes Reverse Transcription and Uncoating in the Nucleus, *Nature Microbiology*, 5, vol 9, p. 1088-1095.
- Dharan A., Campbell E.M. (2018). Role of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins in HIV-1 Infection, *Journal of Virology*, 92, vol 16, p. e00085-18.
- Di Carluccio C., Forgiione M.C., Martini S., Berti F., Molinaro A., Marchetti R., Silipo A. (2021). Investigation of Protein-Ligand Complexes by Ligand-Based NMR Methods, *Carbohydrate Research*, 503, p. 108313.
- Di Nunzio F., Danckaert A., Fricke T., Perez P., Fernandez J., Perret E., Roux P., Shorte S., Charneau P., Diaz-Griffero F., Arhel N.J. (2012). Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration, *PLoS One*, 7, vol 9, p. e46037.
- Diaz-Griffero F., Kar A., Lee M., Stremlau M., Poeschla E., Sodroski J. (2007). Comparative Requirements for the Restriction of Retrovirus Infection by TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp, *Virology*, 369, vol 2, p. 400-410.
- Dick R.A., Mallery D.L., Vogt V.M., James L.C. (2018). IP6 Regulation of HIV Capsid Assembly, Stability, and Uncoating, *Viruses*, 10, vol 11, p. 640.

- Dick R.A., Zadrozny K.K., Xu C., Schur F.K.M., Lyddon T.D., Ricana C.L., Wagner J.M., Perilla J.R., Ganser-Pornillos B.K., Johnson M.C., Pornillos O., Vogt V.M. (2018). Inositol Phosphates Are Assembly Co-Factors for HIV-1, *Nature*, 560, vol 7719, p. 509-512.
- Dietrich I., McEwan W.A., Hosie M.J., Willett B.J. (2011). Restriction of the Feline Lentiviruses by a Synthetic Feline TRIM5–CypA Fusion, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, vol 3, p. 235-242.
- Dostálková A., Kaufman F., Křížová I., Vokatá B., Ruml T., Rumlová M. (2020). In Vitro Quantification of the Effects of IP6 and Other Small Polyanions on Immature HIV-1 Particle Assembly and Core Stability, *Journal of Virology*, 94, vol 20, p. e00991-20.
- Dunham S.P. (2006). Lessons from the Cat: Development of Vaccines against Lentiviruses, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, vol 1, p. 67-77.
- Duvaud S., Gabella C., Lisacek F., Stockinger H., Ioannidis V., Durinx C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as Designed by Its Users, *Nucleic Acids Research*, vol gkab225.
- Elder J.H., Schnölzer M., Hasselkus-Light C.S., Henson M., Lerner D.A., Phillips T.R., Wagaman P.C., Kent S.B. (1993). Identification of Proteolytic Processing Sites within the Gag and Pol Polyproteins of Feline Immunodeficiency Virus., *Journal of Virology*, 67, vol 4, p. 1869-1876.
- Elder J.H., Lin Y.-C., Fink E., Grant C.K. (2010). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) as a Model for Study of Lentivirus Infections: Parallels with HIV, *Current HIV research*, 8, vol 1, p. 73-80.
- Ferreira I.A.T.M., Porterfield J.Z., Gupta R.K., Mlcochova P. (2020). Cell Cycle Regulation in Macrophages and Susceptibility to HIV-1, *Viruses*, 12, vol 8, p. 839.
- Flexner C., Owen A., Siccardi M., Swindells S. (2021). Long-Acting Drugs and Formulations for the Treatment and Prevention of HIV Infection, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57, vol 1, p. 106220.
- Folio C., Sierra N., Dujardin M., Alvarez G., Guillon C. (2017). Crystal Structure of the Full-Length Feline Immunodeficiency Virus Capsid Protein Shows an N-Terminal  $\beta$ -Hairpin in the Absence of N-Terminal Proline, *Viruses*, 9, vol 11, p. 335.
- Franke E.K., Luban J. (1996). Inhibition of HIV-1 Replication by Cyclosporine A or Related Compounds Correlates with the Ability to Disrupt the Gag–Cyclophilin A Interaction, *Virology*, 222, vol 1, p. 279-282.
- Franklin S.P., Troyer J.L., Terwee J.A., Lyren L.M., Boyce W.M., Riley S.P.D., Roelke M.E., Crooks K.R., VandeWoude S. (2007). Frequent Transmission of Immunodeficiency Viruses among Bobcats and Pumas, *Journal of Virology*, 81, vol 20, p. 10961-10969.

Frey S., Richter R.P., Görlich D. (2006). FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties, *Science*, 314, vol 5800, p. 815-817.

Fricke T., Buffone C., Opp S., Valle-Casuso J., Diaz-Griffero F. (2014). BI-2 Destabilizes HIV-1 Cores during Infection and Prevents Binding of CPSF6 to the HIV-1 Capsid, *Retrovirology*, 11, vol 1, p. 1-7.

Fricke T., Diaz-Griffero F. (2016). HIV-1 Capsid Stabilization Assay, *Methods in Molecular Biology*, 1354, p. 39-47.

Fricke T., Valle-Casuso J.C., White T.E., Brandariz-Nuñez A., Bosche W.J., Reszka N., Gorelick R., Diaz-Griffero F. (2013). The ability of TNPO3-depleted cells to inhibit HIV-1 infection requires CPSF6, *Retrovirology*, 10, p. 46.

Futsch N., Mahieux R., Dutartre H. (2018). HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment, *Viruses*, 10, vol 1, p. 1.

Gamble T.R., Yoo S., Vajdos F.F., Schwedler U.K. von, Worthylake D.K., Wang H., McCutcheon J.P., Sundquist W.I., Hill C.P. (1997). Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein, *Science*, 278, vol 5339, p. 849-853.

Ganser-Pornillos B.K., Cheng A., Yeager M. (2007). Structure of Full-Length HIV-1 CA: A Model for the Mature Capsid Lattice, *Cell*, 131, vol 1, p. 70-79.

Ganser-Pornillos B.K., Pornillos O. (2019). Restriction of HIV-1 and Other Retroviruses by TRIM5, *Nature Reviews. Microbiology*, 17, vol 9, p. 546-556.

Gao D., Wu J., Wu Y.-T., Du F., Aroh C., Yan N., Sun L., Chen Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses, *Science*, 341, vol 6148, p. 903-906.

Gemeniano M.C., Sawai E.T., Leutenegger C.M., Sparger E.E. (2003). Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Is Required for Virus Particle Formation and Virus Infectivity, *Journal of Virology*, 77, vol 16, p. 8819-8830.

Gemeniano M.C., Sawai E.T., Sparger E.E. (2004). Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Localizes to the Nucleus and Induces Cell Cycle Arrest, *Virology*, 325, vol 2, p. 167-174.

Ghimire D., Kc Y., Timilsina U., Goel K., Nitz T.J., Wild C.T., Gaur R. (2021). A Single G10T Polymorphism in HIV-1 Subtype C Gag-SP1 Regulates Sensitivity to Maturation Inhibitors, *Retrovirology*, 18, vol 1, p. 1-18.

Ghimire D., Timilsina U., Srivastava T.P., Gaur R. (2017). Insights into the Activity of Maturation Inhibitor PF-46396 on HIV-1 Clade C, *Scientific Reports*, 7, vol 1, p. 43711.

Gifford R.J. (2012). Viral Evolution in Deep Time: Lentiviruses and Mammals, *Trends in Genetics*, 28, vol 2, p. 89-100.

Gilbert A., Silvestre V., Robins R.J., Remaud G.S. (2010). Impact of the Deuterium Isotope Effect on the Accuracy of  $^{13}\text{C}$  NMR Measurements of Site-Specific Isotope Ratios at Natural Abundance in Glucose, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, vol 5, p. 1979-1984.

Gil-Caballero S., Favier A., Brutscher B. (2014). HNCA+, HNCOC+, and HNCACB+ Experiments: Improved Performance by Simultaneous Detection of Orthogonal Coherence Transfer Pathways, *Journal of Biomolecular NMR*, 60, vol 1, p. 1-9.

Goldkamp C.E., Levy J.K., Edinboro C.H., Lachtara J.L. (2008). Seroprevalences of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus in Cats with Abscesses or Bite Wounds and Rate of Veterinarian Compliance with Current Guidelines for Retrovirus Testing, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232, vol 8, p. 1152-1158.

Goldstone D.C., Yap M.W., Robertson L.E., Haire L.F., Taylor W.R., Katzourakis A., Stoye J.P., Taylor I.A. (2010). Structural and Functional Analysis of Prehistoric Lentiviruses Uncovers an Ancient Molecular Interface, *Cell Host & Microbe*, 8, vol 3, p. 248-259.

Gomez-Lucia E., Barquero N., Domenech A. (2018). Maedi-Visna Virus: Current Perspectives, *Veterinary Medicine : Research and Reports*, 9, p. 11-21.

González S.A., Affranchino J.L. (2018). Properties and Functions of Feline Immunodeficiency Virus Gag Domains in Virion Assembly and Budding, *Viruses*, 10, vol 5, p. 261.

Goudreau N., Hucke O., Faucher A.-M., Grand-Maître C., Lepage O., Bonneau P.R., Mason S.W., Titolo S. (2013). Discovery and Structural Characterization of a New Inhibitor Series of HIV-1 Nucleocapsid Function: NMR Solution Structure Determination of a Ternary Complex Involving a 2:1 Inhibitor/NC Stoichiometry, *Journal of Molecular Biology*, 425, vol 11, p. 1982-1998.

Goujon C., Moncorgé O., Bauby H., Doyle T., Ward C.C., Schaller T., Hué S., Barclay W.S., Schulz R., Malim M.H. (2013). Human MX2 Is an Interferon-Induced Post-Entry Inhibitor of HIV-1 Infection, *Nature*, 502, vol 7472, p. 559-562.

Gres A.T., Kirby K.A., KewalRamani V.N., Tanner J.J., Pornillos O., Sarafianos S.G. (2015). X-Ray Crystal Structures of Native HIV-1 Capsid Protein Reveal Conformational Variability, *Science*, 349, vol 6243, p. 99-103.

Grzesiek S., Bax A. (1992). An Efficient Experiment for Sequential Backbone Assignment of Medium-Sized Isotopically Enriched Proteins, *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 99, vol 1, p. 201-207.

Guo C., Yao X., Wang K., Wang J., Wang Y. (2020). Comparison of HIV-1 Gag and NCp7 in Their Selectivity for Package Signal, Affinity for Stem-Loop 3, and Zn<sup>2+</sup> Content, *Biochimie*, 179, p. 135-145.

Gupta S., Louis J.M., Tycko R. (2020). Effects of an HIV-1 Maturation Inhibitor on the Structure and Dynamics of CA-SP1 Junction Helices in Virus-like Particles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, vol 19, p. 10286-10293.

Haase A.T. (1986). Pathogenesis of Lentivirus Infections, *Nature*, 322, vol 6075, p. 130-136.

Hartmann K. (2011). Clinical Aspects of Feline Immunodeficiency and Feline Leukemia Virus Infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, vol 3, p. 190-201.

Hartmann K. (2012). Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review, *Viruses*, 4, vol 11, p. 2684-2710.

Hoffmann-Fezer G., Thum J., Ackley C., Herbold M., Mysliwicz J., Thefeld S., Hartmann K., Kraft W. (1992). Decline in CD4<sup>+</sup> Cell Numbers in Cats with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus Infection, *Journal of Virology*, 66, vol 3, p. 1484-1488.

Hosie M.J., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M.G., Radford A.D., Thiry E., Truyen U., Horzinek M.C., Lloret A. (2009). Feline Immunodeficiency: ABCD Guidelines on Prevention and Management, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, vol 7, p. 575-584.

Hosie M.J., Pajek D., Samman A., Willett B.J. (2011). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Neutralization: A Review, *Viruses*, 3, vol 10, p. 1870-1890.

Hosie M.J., Techakriengkrai N., Bęczkowski P.M., Harris M., Logan N., Willett B.J. (2017). The Comparative Value of Feline Virology Research: Can Findings from the Feline Lentiviral Vaccine Be Translated to Humans?, *Veterinary Sciences*, 4, vol 1, p. 7.

Iaco A.D., Santoni F., Vannier A., Guipponi M., Antonarakis S., Luban J. (2013). TNPO3 Protects HIV-1 Replication from CPSF6-Mediated Capsid Stabilization in the Host Cell Cytoplasm, *Retrovirology*, 10, vol 1, p. 1-18.

Iraci N., Tabarrini O., Santi C., Sancineto L. (2018). NCp7: Targeting a Multitask Protein for next-Generation Anti-HIV Drug Development Part 2. Noncovalent Inhibitors and Nucleic Acid Binders, *Drug Discovery Today*, 23, vol 3, p. 687-695.

Ivanov D., Tsodikov O.V., Kasanov J., Ellenberger T., Wagner G., Collins T. (2007). Domain-Swapped Dimerization of the HIV-1 Capsid C-Terminal Domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, vol 11, p. 4353-4358.

Iwata D., Holloway S.A. (2008). Molecular Subtyping of Feline Immunodeficiency Virus from Cats in Melbourne, *Australian Veterinary Journal*, 86, vol 10, p. 385-389.

- Jacques D.A., McEwan W.A., Hilditch L., Price A.J., Towers G.J., James L.C. (2016). HIV-1 Uses Dynamic Capsid Pores to Import Nucleotides and Fuel Encapsidated DNA Synthesis, *Nature*, 536, vol 7616, p. 349.
- Jerabek-Willemsen M., André T., Wanner R., Roth H.M., Duhr S., Baaske P., Breitsprecher D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond, *Journal of Molecular Structure*, 1077, p. 101-113.
- Jiang X., Wu G., Zalloum W.A., Meuser M.E., Dick A., Sun L., Chen C.-H., Kang D., Jing L., Jia R., Cocklin S., Lee K.-H., Liu X., Zhan P. (2019). Discovery of novel 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole phenylalanine derivatives as HIV-1 capsid inhibitors, *Rsc Advances*, 9, vol 50, p. 28961-28986.
- Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W.J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S.J. (2006). The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment, *Science*, 311, vol 5757, p. 73-77.
- Kane M., Rebensburg S.V., Takata M.A., Zang T.M., Yamashita M., Kvaratskhelia M., Bieniasz P.D. (2018). Nuclear Pore Heterogeneity Influences HIV-1 Infection and the Antiviral Activity of MX2, *eLife*, 7, p. e35738.
- Kane M., Yadav S.S., Bitzegeio J., Kutluay S.B., Zang T., Wilson S.J., Schoggins J.W., Rice C.M., Yamashita M., Hatziioannou T., Bieniasz P.D. (2013). Mx2 Is an Interferon Induced Inhibitor of HIV-1 Infection, *Nature*, 502, vol 7472, p. 563-566.
- Kann R., Kyaw-Tanner M., Seddon J., Lehrbach P., Zwijnenberg R., Meers J. (2006). Molecular Subtyping of Feline Immunodeficiency Virus from Domestic Cats in Australia, *Australian Veterinary Journal*, 84, vol 4, p. 112-116.
- Kay L.E., Gardner K.H. (1997). Solution NMR Spectroscopy beyond 25 KDa, *Current Opinion in Structural Biology*, 7, vol 5, p. 722-731.
- Kelly B.N., Kyere S., Kinde I., Tang C., Howard B.R., Robinson H., Sundquist W.I., Summers M.F., Hill C.P. (2007). Structure of the Antiviral Assembly Inhibitor CAP-1 Complex with the HIV-1 CA Protein, *Journal of Molecular Biology*, 373, vol 2, p. 355-366.
- Kenyon J.C., Lever A.M.L. (2011). The molecular biology of Feline Immunodeficiency Virus (FIV), *Viruses*, 3, vol 11, p. 2192-2213.
- Khwaja A., Galilee M., Marx A., Alian A. (2016). Structure of FIV Capsid C-Terminal Domain Demonstrates Lentiviral Evasion of Genetic Fragility by Coevolved Substitutions, *Scientific Reports*, 6, vol 1, p. 24957.
- Kleinpeter A.B., Freed E.O. (2020). HIV-1 Maturation: Lessons Learned from Inhibitors, *Viruses*, 12, vol 9, p. 940.
- Knipe D.M., Howley P. (2013). *Fields Virology*, 6<sup>e</sup> édition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

- Koma T., Kotani O., Miyakawa K., Ryo A., Yokoyama M., Doi N., Adachi A., Sato H., Nomaguchi M. (2019). Allosteric Regulation of HIV-1 Capsid Structure for Gag Assembly, Virion Production, and Viral Infectivity by a Disordered Interdomain Linker, *Journal of Virology*, 93, vol 17, p. JVI.00381-19.
- Konvalinka J., Kräusslich H.-G., Müller B. (2015). Retroviral Proteases and Their Roles in Virion Maturation, *Virology*, 479-480, p. 403-417.
- Koshy R., Gallo R.C., Wong-Staal F. (1980). Characterization of the Endogenous Feline Leukemia Virus-Related DNA Sequences in Cats and Attempts to Identify Exogenous Viral Sequences in Tissues of Virus-Negative Leukemic Animals, *Virology*, 103, vol 2, p. 434-445.
- Krishnan L., Matreyek K.A., Oztop I., Lee K., Tipper C.H., Li X., Dar M.J., KewalRamani V.N., Engelman A. (2010). The Requirement for Cellular Transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during Infection Maps to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid and Not Integrase, *Journal of Virology*, 84, vol 1, p. 397-406.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, vol 5259, p. 680-685.
- Laskowski R.A., Swindells M.B. (2011). LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51, vol 10, p. 2778-2786.
- Lee J., Malmberg J.L., Wood B.A., Hladky S., Troyer R., Roelke M., Cunningham M., McBride R., Vickers W., Boyce W., Boydston E., Serieys L., Riley S., Crooks K., VandeWoude S. (2017). Feline Immunodeficiency Virus Cross-Species Transmission: Implications for Emergence of New Lentiviral Infections, *Journal of Virology*, 91, vol 5, p. e02134-16.
- Lee K., Ambrose Z., Martin T.D., Oztop I., Mulky A., Julias J.G., Vandegraaff N., Baumann J.G., Wang R., Yuen W., Takemura T., Shelton K., Taniuchi I., Li Y., Sodroski J., Littman D.R., Coffin J.M., Hughes S.H., Unutmaz D., Engelman A., KewalRamani V.N. (2010). Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1, *Cell Host & Microbe*, 7, vol 3, p. 221-233.
- Lee W., Bahrami A., Dashti H.T., Eghbalnia H.R., Tonelli M., Westler W.M., Markley J.L. (2019). I-PINE Web Server: An Integrative Probabilistic NMR Assignment System for Proteins, *Journal of Biomolecular NMR*, 73, vol 5, p. 213-222.
- Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. (2018). Virus Taxonomy: The Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), *Nucleic Acids Research*, 46, vol D1, p. D708-D717.
- Lelek M., Casartelli N., Pellin D., Rizzi E., Souque P., Severgnini M., Di Serio C., Fricke T., Diaz-Griffero F., Zimmer C., Charneau P., Di Nunzio F. (2015). Chromatin Organization at the Nuclear Pore Favours HIV Replication, *Nature Communications*, 6, p. 6483.

- LeMaster D.M. (1990). Deuterium Labelling in NMR Structural Analysis of Larger Proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23, vol 2, p. 133-174.
- Leroux C., Cadoré J.-L., Montelaro R.C. (2004). Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): What Has HIV's Country Cousin Got to Tell Us?, *Veterinary Research*, 35, vol 4, p. 485-512.
- Li G., Verheyen J., Rhee S.-Y., Voet A., Vandamme A.-M., Theys K. (2013). Functional Conservation of HIV-1 Gag: Implications for Rational Drug Design, *Retrovirology*, 10, vol 1, p. 1-11.
- Lin D.H., Zimmermann S., Stuwe T., Stuwe E., Hoelz A. (2013). Structural and Functional Analysis of the C-Terminal Domain of Nup358/RanBP2, *Journal of Molecular Biology*, 425, vol 8, p. 1318-1329.
- Lin T.-Y., Emerman M. (2006). Cyclophilin A Interacts with Diverse Lentiviral Capsids, *Retrovirology*, 3, vol 1, p. 1-12.
- Linial M. (2000). Why Aren't Foamy Viruses Pathogenic?, *Trends in Microbiology*, 8, vol 6, p. 284-289.
- Link J.O., Rhee M.S., Tse W.C., Zheng J., Somoza J.R., Rowe W., Begley R., Chiu A., Mulato A., Hansen D., Singer E., Tsai L.K., Bam R.A., Chou C.-H., Canales E., Brizgys G., Zhang J.R., Li J., Graupe M., Morganelli P., Liu Q., Wu Q., Halcomb R.L., Saito R.D., Schroeder S.D., Lazerwith S.E., Bondy S., Jin D., Hung M., Novikov N., Liu X., Villaseñor A.G., Cannizzaro C.E., Hu E.Y., Anderson R.L., Appleby T.C., Lu B., Mwangi J., Liclican A., Niedziela-Majka A., Papalia G.A., Wong M.H., Leavitt S.A., Xu Y., Koditek D., Stepan G.J., Yu H., Pagratis N., Clancy S., Ahmadyar S., Cai T.Z., Sellers S., Wolckenhauer S.A., Ling J., Callebaut C., Margot N., Ram R.R., Liu Y.-P., Hyland R., Sinclair G.I., Ruane P.J., Crofoot G.E., McDonald C.K., Brainard D.M., Lad L., Swaminathan S., Sundquist W.I., Sakowicz R., Chester A.E., Lee W.E., Daar E.S., Yant S.R., Cihlar T. (2020). Clinical Targeting of HIV Capsid Protein with a Long-Acting Small Molecule, *Nature*, 584, vol 7822, p. 614-618.
- Litster A.L. (2014). Transmission of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) among Cohabiting Cats in Two Cat Rescue Shelters, *The Veterinary Journal*, 201, vol 2, p. 184-188.
- Little S. (2011). A Review of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus Seroprevalence in Cats in Canada, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, vol 3, p. 243-245.
- Liu Z., Pan Q., Ding S., Qian J., Xu F., Zhou J., Cen S., Guo F., Liang C. (2013). The Interferon-Inducible MxB Protein Inhibits HIV-1 Infection, *Cell Host & Microbe*, 14, vol 4, p. 398-410.
- Llano M., Vanegas M., Fregoso O., Saenz D., Chung S., Peretz M., Poeschla E.M. (2004). LEDGF/p75 Determines Cellular Trafficking of Diverse Lentiviral but Not Murine Oncoretroviral Integrase Proteins and Is a Component of Functional Lentiviral Preintegration Complexes, *Journal of Virology*, 78, vol 17, p. 9524-9537.

- Long M., Cantrelle F.-X., Robert X., Boll E., Sierra N., Gouet P., Hanouille X., Alvarez G.I., Guillon C. (2021). Identification of a Potential Inhibitor of the FIV p24 Capsid Protein and Characterization of Its Binding Site, *Biochemistry*, 60, vol 24, p. 1896-1908.
- Lu M., Russell R.W., Bryer A.J., Quinn C.M., Hou G., Zhang H., Schwieters C.D., Perilla J.R., Gronenborn A.M., Polenova T. (2020). Atomic-Resolution Structure of HIV-1 Capsid Tubes by Magic-Angle Spinning NMR, *Nature Structural & Molecular Biology*, 27, vol 9, p. 863-869.
- Malikov V., Silva E.S. da, Jovasevic V., Bennett G., Souza Aranha Vieira D.A. de, Schulte B., Diaz-Griffero F., Walsh D., Naghavi M.H. (2015). HIV-1 Capsids Bind and Exploit the Kinesin-1 Adaptor FEZ1 for Inward Movement to the Nucleus, *Nature Communications*, 6, vol 1, p. 6660.
- Mallery D.L., Kleinpeter A.B., Renner N., Faysal K.M.R., Novikova M., Kiss L., Wilson M.S.C., Ahsan B., Ke Z., Briggs J.A.G., Saiardi A., Böcking T., Freed E.O., James L.C. (2021). A Stable Immature Lattice Packages IP6 for HIV Capsid Maturation, *Science Advances*, 7, vol 11, p. eabe4716.
- Mallery D.L., Márquez C.L., McEwan W.A., Dickson C.F., Jacques D.A., Anandapadamanaban M., Bichel K., Towers G.J., Saiardi A., Böcking T., James L.C. (2018). IP6 Is an HIV Pocket Factor That Prevents Capsid Collapse and Promotes DNA Synthesis Sundquist W.I. (éd.), *eLife*, 7, p. e35335.
- Maltsev A.S., Ying J., Bax A. (2012). Deuterium Isotope Shifts for Backbone <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C Nuclei in Intrinsically Disordered Protein -Synuclein, *Journal of Biomolecular NMR*, 54, vol 2, p. 181-191.
- Manrique M.L., Rauddi M.L., González S.A., Affranchino J.L. (2004). Functional Domains in the Feline Immunodeficiency Virus Nucleocapsid Protein, *Virology*, 327, vol 1, p. 83-92.
- Marcelin A.-G., Charpentier C., Jary A., Perrier M., Margot N., Callebaut C., Calvez V., Descamps D. (2020). Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naive and -experienced patients, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, vol 6, p. 1588-1590.
- Marchand C., Lemay G., Archambault D. (2020). Identification of the Nuclear and Nucleolar Localization Signals of the Feline Immunodeficiency Virus Rev Protein, *Virus Research*, 290, p. 198153.
- Margot N., Ram R., Rhee M., Callebaut C. (2021). Absence of Lenacapavir (GS-6207) Phenotypic Resistance in HIV Gag Cleavage Site Mutants and in Isolates with Resistance to Existing Drug Classes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65, vol 3, p. e02057-20.
- Marini B., Kertesz-Farkas A., Ali H., Lucic B., Lisek K., Manganaro L., Pongor S., Luzzati R., Recchia A., Mavilio F., Giacca M., Lusica M. (2015). Nuclear Architecture Dictates HIV-1 Integration Site Selection, *Nature*, 521, vol 7551, p. 227-231.

- Martin D.E., Salzwedel K., Allaway G.P. (2008). Bevirimat: A Novel Maturation Inhibitor for the Treatment of HIV-1 Infection:, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 19, vol 3, p. 107-113.
- Matreyek K.A., Yücel S.S., Li X., Engelman A. (2013). Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity, *PLoS Pathogens*, 9, vol 10, p. e1003693.
- Matsuoka M. (2005). Human T-Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I) Infection and the Onset of Adult T-Cell Leukemia (ATL), *Retrovirology*, 2, vol 1, p. 1-13.
- Matthews S., Barlow P., Clark N., Kingsman S., Kingsman A., Campbell I. (1995). Refined Solution Structure of P17, the HIV Matrix Protein, *Biochemical Society Transactions*, 23, vol 4, p. 725-729.
- Mayzel M., Rosenlöw J., Isaksson L., Orekhov V.Y. (2014). Time-Resolved Multidimensional NMR with Non-Uniform Sampling, *Journal of biomolecular NMR*, 58, vol 2, p. 129-139.
- Melén K., Keskinen P., Ronni T., Sareneva T., Lounatmaa K., Julkunen I. (1996). Human MxB Protein, an Interferon- $\alpha$ -Inducible GTPase, Contains a Nuclear Targeting Signal and Is Localized in the Heterochromatin Region beneath the Nuclear Envelope, *Journal of Biological Chemistry*, 271, vol 38, p. 23478-23486.
- Miller C., Abdo Z., Ericsson A., Elder J., VandeWoude S. (2018). Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis, *Viruses*, 10, vol 4, p. 206.
- Miller C., Boegler K., Carver S., MacMillan M., Bielefeldt-Ohmann H., VandeWoude S. (2017). Pathogenesis of Oral FIV Infection, *PLoS One*, 12, vol 9, p. e0185138.
- Miller M., Schneider J., Sathyanarayana B.K., Toth M.V., Marshall G.R., Clawson L., Selk L., Kent S.B., Wlodawer A. (1989). Structure of Complex of Synthetic HIV-1 Protease with a Substrate-Based Inhibitor at 2.3 Å Resolution, *Science*, 246, vol 4934, p. 1149-1152.
- Mohammadi H., Bienzle D. (2012). Pharmacological Inhibition of Feline Immunodeficiency Virus (FIV), *Viruses*, 4, vol 5, p. 708-724.
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, 30, vol 16, p. 2785-2791.
- Mouzakis K.D., Lang A.L., Vander Meulen K.A., Easterday P.D., Butcher S.E. (2013). HIV-1 Frameshift Efficiency Is Primarily Determined by the Stability of Base Pairs Positioned at the mRNA Entrance Channel of the Ribosome, *Nucleic Acids Research*, 41, vol 3, p. 1901-1913.
- Mukherjee S., Boutant E., Réal E., Mély Y., Anton H. (2021). Imaging Viral Infection by Fluorescence Microscopy: Focus on HIV-1 Early Stage, *Viruses*, 13, vol 2, p. 213.

- Murphy R.E., Saad J.S. (2020). The Interplay between HIV-1 Gag Binding to the Plasma Membrane and Env Incorporation, *Viruses*, 12, vol 5, p. 548.
- Murray S.M., Linial M.L. (2019). Simian Foamy Virus Co-Infections, *Viruses*, 11, vol 10, p. 902.
- Naldini L. (1998). Lentiviruses as Gene Transfer Agents for Delivery to Non-Dividing Cells, *Current Opinion in Biotechnology*, 9, vol 5, p. 457-463.
- Nath M.D., Peterson D.L. (2001). In Vitro Assembly of Feline Immunodeficiency Virus Capsid Protein: Biological Role of Conserved Cysteines, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392, vol 2, p. 287-294.
- Novikova M., Adams L.J., Fontana J., Gres A.T., Balasubramaniam M., Winkler D.C., Kudchodkar S.B., Soheilian F., Sarafianos S.G., Steven A.C., Freed E.O. (2018). Identification of a Structural Element in HIV-1 Gag Required for Virus Particle Assembly and Maturation, *mBio*, 9, vol 5, p. e01567-18.
- Novikova M., Zhang Y., Freed E.O., Peng K. (2019). Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle, *Virologica Sinica*, 34, vol 2, p. 119-134.
- Novotney C., English R.V., Housman J., Davidson M.G., Nasisse M.P., Jeng C.R., Davis W.C., Tompkins M.B. (1990). Lymphocyte Population Changes in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus, *AIDS*, 4, vol 12, p. 1213-1218.
- Obal G., Trajtenberg F., Carrión F., Tomé L., Larrieux N., Zhang X., Pritsch O., Buschiazio A. (2015). Conformational Plasticity of a Native Retroviral Capsid Revealed by X-Ray Crystallography, *Science*, 349, vol 6243, p. 95-98.
- Okazaki H., Kaneko C., Hirahara M., Watanabe S., Tochio N., Kigawa T., Nishimura C. (2014). Long-Range Effects of Tag Sequence on Marginally Stabilized Structure in HIV-1 P24 Capsid Protein Monitored Using NMR, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1844, vol 9, p. 1638-1647.
- Opp S., Fricke T., Shepard C., Kovalskyy D., Bhattacharya A., Herkules F., Ivanov D.N., Kim B., Valle-Casuso J., Diaz-Griffero F. (2017). The Small-Molecule 3G11 Inhibits HIV-1 Reverse Transcription, *Chemical Biology & Drug Design*, 89, vol 4, p. 608-618.
- Ozorowski G., Torres J.L., Santos-Martins D., Forli S., Ward A.B. (2020). A Strain-Specific Inhibitor of Receptor-Bound HIV-1 Targets a Pocket near the Fusion Peptide, *Cell Reports*, 33, vol 8, p. 108428.
- Parseval A. de, Elder J.H. (1999). Demonstration That Orf2 Encodes the Feline Immunodeficiency Virus Transactivating (Tat) Protein and Characterization of a Unique Gene Product with Partial Rev Activity, *Journal of Virology*, 73, vol 1, p. 608-617.

- Pecon-Slattery J., Troyer J.L., Johnson W.E., O'Brien S.J. (2008). Evolution of Feline Immunodeficiency Virus in Felidae: Implications for Human Health and Wildlife Ecology, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, vol 1-2, p. 32-44.
- Pedersen N.C., Ho E.W., Brown M.L., Yamamoto J.K. (1987). Isolation of a T-Lymphotropic Virus from Domestic Cats with an Immunodeficiency-like Syndrome, *Science*, 235, vol 4790, p. 790-793.
- Peng K., Muranyi W., Glass B., Laketa V., Yant S.R., Tsai L., Cihlar T., Müller B., Kräusslich H.-G. (2014). Quantitative Microscopy of Functional HIV Post-Entry Complexes Reveals Association of Replication with the Viral Capsid, *eLife*, 3, p. e04114.
- Perron M.J., Stremlau M., Lee M., Javanbakht H., Song B., Sodroski J. (2007). The Human TRIM5 $\alpha$  Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid, *Journal of Virology*, 81, vol 5, p. 2138-2148.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis, *Journal of Computational Chemistry*, 25, vol 13, p. 1605-1612.
- Phillips T.R., Lamont C., Konings D.A., Shacklett B.L., Hamson C.A., Luciw P.A., Elder J.H. (1992). Identification of the Rev Transactivation and Rev-Responsive Elements of Feline Immunodeficiency Virus., *Journal of Virology*, 66, vol 9, p. 5464-5471.
- Pistello M., Moscardini M., Mazzetti P., Bonci F., Zaccaro L., Isola P., Freer G., Specter S., Matteucci D., Bendinelli M. (2002). Development of Feline Immunodeficiency Virus ORF-A (Tat) Mutants: In Vitro and in Vivo Characterization, *Virology*, 298, vol 1, p. 84-95.
- Pornillos O., Ganser-Pornillos B.K., Banumathi S., Hua Y., Yeager M. (2010). Disulfide Bond Stabilization of the Hexameric Capsomer of Human Immunodeficiency Virus, *Journal of Molecular Biology*, 401, vol 5, p. 985-995.
- Pornillos O., Ganser-Pornillos B.K., Kelly B.N., Hua Y., Whitby F.G., Stout C.D., Sundquist W.I., Hill C.P., Yeager M. (2009). X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid, *Cell*, 137, vol 7, p. 1282-1292.
- Pornillos O., Ganser-Pornillos B.K., Yeager M. (2011). Atomic-Level Modelling of the HIV Capsid, *Nature*, 469, vol 7330, p. 424-427.
- Price A.J., Jacques D.A., McEwan W.A., Fletcher A.J., Essig S., Chin J.W., Halambage U.D., Aiken C., James L.C. (2014). Host Cofactors and Pharmacologic Ligands Share an Essential Interface in HIV-1 Capsid That Is Lost upon Disassembly, *PLoS Pathogens*, 10, vol 10, p. e1004459.
- Pu R., Coleman J., Omori M., Arai M., Hohdatsu T., Huang C., Tanabe T., Yamamoto J.K. (2001). Dual-Subtype FIV Vaccine Protects Cats against in Vivo Swarms of Both Homologous and Heterologous Subtype FIV Isolates, *AIDS*, 15, vol 10, p. 1225-1237.

- Purdy M.D., Shi D., Chrustowicz J., Hattne J., Gonen T., Yeager M. (2018). MicroED Structures of HIV-1 Gag CTD-SP1 Reveal Binding Interactions with the Maturation Inhibitor Bevirimat, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, vol 52, p. 13258-13263.
- Qi Z., Shi W., Xue N., Pan C., Jing W., Liu K., Jiang S. (2008). Rationally Designed Anti-HIV Peptides Containing Multifunctional Domains as Molecule Probes for Studying the Mechanisms of Action of the First and Second Generation HIV Fusion Inhibitors, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, vol 44, p. 30376-30384.
- Rankovic S., Ramalho R., Aiken C., Rousso I. (2018). PF74 Reinforces the HIV-1 Capsid To Impair Reverse Transcription-Induced Uncoating, *Journal of Virology*, 92, vol 20, p. e00845-18.
- Rankovic S., Varadarajan J., Ramalho R., Aiken C., Rousso I. (2017). Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly, *Journal of Virology*, 91, vol 12, p. e00289-17.
- Reed J.C., Westergreen N., Barajas B.C., Ressler D.T.B., Phuong D.J., Swain J.V., Lingappa V.R., Lingappa J.R. (2018). The Formation of RNA Granule-Derived Capsid Assembly Intermediates Appears to Be Conserved between HIV-1 and the Non-Primate Lentivirus FIV, *Journal of Virology*, 92, vol 9, p. e01761-17.
- Reil H., Kollmus H., Weidle U.H., Hauser H. (1993). A Heptanucleotide Sequence Mediates Ribosomal Frameshifting in Mammalian Cells., *Journal of Virology*, 67, vol 9, p. 5579-5584.
- Renner N., Mallery D.L., Faysal K.M.R., Peng W., Jacques D.A., Böcking T., James L.C. (2021). A Lysine Ring in HIV Capsid Pores Coordinates IP6 to Drive Mature Capsid Assembly, *PLoS Pathogens*, 17, vol 2, p. e1009164.
- Rhee S.-Y., Taylor J., Fessel W.J., Kaufman D., Towner W., Troia P., Ruane P., Hellinger J., Shirvani V., Zolopa A., Shafer R.W. (2010). HIV-1 Protease Mutations and Protease Inhibitor Cross-Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, vol 10, p. 4253-4261.
- Richardson J., Pancino G., Merat R., Leste-Lasserre T., Morailon A., Schneider-Mergener J., Alizon M., Sonigo P., Heveker N. (1999). Shared Usage of the Chemokine Receptor CXCR4 by Primary and Laboratory-Adapted Strains of Feline Immunodeficiency Virus, *Journal of Virology*, 73, vol 5, p. 3661-3671.
- Robichon C., Luo J., Causey T.B., Benner J.S., Samuelson J.C. (2011). Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography ▽, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, vol 13, p. 4634-4646.
- Rocquigny H. de, El Meshri S.E., Richert L., Didier P., Darlix J.-L., Mély Y. (2014). Role of the Nucleocapsid Region in HIV-1 Gag Assembly as Investigated by Quantitative Fluorescence-Based Microscopy, *Virus Research*, 193, p. 78-88.

Roe T., Reynolds T.C., Yu G., Brown P.O. (1993). Integration of Murine Leukemia Virus DNA Depends on Mitosis., *The EMBO Journal*, 12, vol 5, p. 2099-2108.

Roelke M.E., Brown M.A., Troyer J.L., Winterbach H., Winterbach C., Hemson G., Smith D., Johnson R.C., Pecon-Slattery J., Roca A.L., Alexander K.A., Klein L., Martelli P., Krishnasamy K., O'Brien S.J. (2009). Pathological Manifestations of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in Wild African Lions, *Virology*, 390, vol 1, p. 1-12.

Rogers A.B., Hoover E.A. (1998). Maternal-Fetal Feline Immunodeficiency Virus Transmission: Timing and Tissue Tropisms, *The Journal of Infectious Diseases*, 178, vol 4, p. 960-967.

Rossi E., Meuser M.E., Cunanan C.J., Cocklin S. (2021). Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein, *Life*, 11, vol 2, p. 100.

Roux A., Leroy H., Muylder B.D., Bracq L., Oussous S., Dusanter-Fourt I., Chougui G., Tacine R., Randriamampita C., Desjardins D., Grand R.L., Bouillaud F., Benichou S., Margottin-Goguet F., Cheynier R., Bismuth G., Mangeney M. (2019). FOXO1 Transcription Factor Plays a Key Role in T Cell—HIV-1 Interaction, *PLoS Pathogens*, 15, vol 5.

Rubin H. (2011). The Early History of Tumor Virology: Rous, RIF, and RAV, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, vol 35, p. 14389-14396.

Saenz D.T., Teo W., Olsen J.C., Poeschla E.M. (2005). Restriction of Feline Immunodeficiency Virus by Ref1, Lvl1, and Primate TRIM5 $\alpha$  Proteins, *Journal of Virology*, 79, vol 24, p. 15175-15188.

Sahay B., Yamamoto J.K. (2018). Lessons Learned in Developing a Commercial FIV Vaccine: The Immunity Required for an Effective HIV-1 Vaccine, *Viruses*, 10, vol 5, p. 277.

Saito A., Ferhadian D., Sowd G.A., Serrao E., Shi J., Halambage U.D., Teng S., Soto J., Siddiqui M.A., Engelman A.N., Aiken C., Yamashita M. (2016). Roles of Capsid-Interacting Host Factors in Multimodal Inhibition of HIV-1 by PF74, *Journal of Virology*, 90, vol 12, p. 5808-5823.

Santos da Silva E., Shanmugapriya S., Malikov V., Gu F., Delaney M.K., Naghavi M.H. (2020). HIV-1 Capsids Mimic a Microtubule Regulator to Coordinate Early Stages of Infection, *The EMBO Journal*, 39, vol 20, p. e104870.

Sastri J., Campbell E.M. (2011). Recent Insights into the Mechanism and Consequences of TRIM5 $\alpha$  Retroviral Restriction, *AIDS research and human retroviruses*, 27, vol 3, p. 231-238.

Schur F.K.M., Obr M., Hagen W.J.H., Wan W., Jakobi A.J., Kirkpatrick J.M., Sachse C., Kräusslich H.-G., Briggs J.A.G. (2016). An Atomic Model of HIV-1 Capsid-SP1 Reveals Structures Regulating Assembly and Maturation, *Science*, 353, vol 6298, p. 506-508.

- Scoca V., Di Nunzio F. (2021). The HIV-1 Capsid: From Structural Component to Key Factor for Host Nuclear Invasion, *Viruses*, 13, vol 2, p. 273.
- Scott V.L., Burgess S.C., Shack L.A., Lockett N.N., Coats K.S. (2008). Expression of CD134 and CXCR4 mRNA in Term Placentas from FIV-infected and Control Cats, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, vol 1-2, p. 90-96.
- Seidel S.A.I., Dijkman P.M., Lea W.A., Bogaart G. van den, Jerabek-Willemsen M., Lazic A., Joseph J.S., Srinivasan P., Baaske P., Simeonov A., Katritch I., Melo F.A., Ladbury J.E., Schreiber G., Watts A., Braun D., Duhr S. (2013). Microscale Thermophoresis Quantifies Biomolecular Interactions under Previously Challenging Conditions, *Methods*, 59, vol 3, p. 301-315.
- Seissler T., Marquet R., Paillart J.-C. (2017). Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins, *Viruses*, 9, vol 11, p. 322.
- Sellon R.K., Jordan H.L., Kennedy-Stoskopf S., Tompkins M.B., Tompkins W.A. (1994). Feline Immunodeficiency Virus Can Be Experimentally Transmitted via Milk during Acute Maternal Infection., *Journal of Virology*, 68, vol 5, p. 3380-3385.
- Serrière J., Fenel D., Schoehn G., Gouet P., Guillon C. (2013). Biophysical Characterization of the Feline Immunodeficiency Virus P24 Capsid Protein Conformation and In Vitro Capsid Assembly, *PLoS One*, 8, vol 2, p. e56424.
- Serrière J., Robert X., Perez M., Gouet P., Guillon C. (2013). Biophysical Characterization and Crystal Structure of the Feline Immunodeficiency Virus P15 Matrix Protein, *Retrovirology*, 10, vol 1, p. 1-17.
- Sham H.L., Kempf D.J., Molla A., Marsh K.C., Kumar G.N., Chen C.M., Kati W., Stewart K., Lal R., Hsu A., Betebenner D., Korneyeva M., Vasavanonda S., McDonald E., Saldivar A., Wideburg N., Chen X., Niu P., Park C., Jayanti V., Grabowski B., Granneman G.R., Sun E., Japour A.J., Leonard J.M., Plattner J.J., Norbeck D.W. (1998). ABT-378, a Highly Potent Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Protease, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, vol 12, p. 3218-3224.
- Sharp P.M., Hahn B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1, vol 1, p. a006841.
- Shimojima M., Miyazawa T., Ikeda Y., McMonagle E.L., Haining H., Akashi H., Takeuchi Y., Hosie M.J., Willett B.J. (2004). Use of CD134 As a Primary Receptor by the Feline Immunodeficiency Virus, *Science*, 303, vol 5661, p. 1192-1195.
- Shvadchak V., Zgheib S., Basta B., Humbert N., Langedijk J., Morris M.C., Ciaco S., Maskri O., Darlix J.-L., Mauffret O., Fossé P., Réal E., Mély Y. (2018). Rationally Designed Peptides as Efficient Inhibitors of Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein, *Biochemistry*, 57, vol 30, p. 4562-4573.
- Sierra N., Folio C., Robert X., Long M., Guillon C., Álvarez G. (2018). Looking for Novel Capsid Protein Multimerization Inhibitors of Feline Immunodeficiency Virus, *Pharmaceuticals*, 11, vol 3, p. 67.

Singh K., Gallazzi F., Hill K.J., Burke D.H., Lange M.J., Quinn T.P., Neogi U., Sönnerborg A. (2019). GS-CA Compounds: First-In-Class HIV-1 Capsid Inhibitors Covering Multiple Grounds, *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1227.

Smaga S.S., Xu C., Summers B.J., Digianantonio K.M., Perilla J.R., Xiong Y. (2019). MxB Restricts HIV-1 by Targeting the Tri-Hexameric Interface of the Viral Capsid, *Structure*, 27, vol 8, p. 1234-1245.e5.

Solyom Z., Schwarten M., Geist L., Konrat R., Willbold D., Brutscher B. (2013). BEST-TROSY Experiments for Time-Efficient Sequential Resonance Assignment of Large Disordered Proteins, *Journal of Biomolecular NMR*, 55, vol 4, p. 311-321.

Song G. (2020). Uncovering the Release Mechanism of Nucleotide Import by HIV-1 Capsid, *Physical Biology*, 18, vol 1, p. 016004.

Spector C., Mele A.R., Wigdahl B., Nonnemacher M.R. (2019). Genetic Variation and Function of the HIV-1 Tat Protein, *Medical Microbiology and Immunology*, 208, vol 2, p. 131-169.

Sticht J., Humbert M., Findlow S., Bodem J., Müller B., Dietrich U., Werner J., Kräusslich H.-G. (2005). A Peptide Inhibitor of HIV-1 Assembly in Vitro, *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, vol 8, p. 671-677.

Stremlau M., Perron M., Welikala S., Sodroski J. (2005). Species-Specific Variation in the B30.2(SPRY) Domain of TRIM5 $\alpha$  Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction, *Journal of Virology*, 79, vol 5, p. 3139-3145.

Sumner R.P., Harrison L., Touizer E., Peacock T.P., Spencer M., Zuliani-Alvarez L., Towers G.J. (2020). Disrupting HIV-1 Capsid Formation Causes CGAS Sensing of Viral DNA, *The EMBO journal*, 39, vol 20, p. e103958.

Sundstrom M., Chatterji U., Schaffer L., Rozières S. de, Elder J.H. (2008). Feline Immunodeficiency Virus OrfA Alters Gene Expression of Splicing Factors and Proteasome-Ubiquitination Proteins, *Virology*, 371, vol 2, p. 394-404.

Suzuki Y., Craigie R. (2007). The Road to Chromatin — Nuclear Entry of Retroviruses, *Nature Reviews Microbiology*, 5, vol 3, p. 187-196.

Szilasi A., Dénes L., Krikó E., Heenemann K., Ertl R., Mándoki M., Vahlenkamp T.W., Balka G. (2019). Prevalence of Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukaemia Virus in Domestic Cats in Hungary, *JFMS open reports*, 5, vol 2, p. 2055116919892094.

Tang C., Loeliger E., Kinde I., Kyere S., Mayo K., Barklis E., Sun Y., Huang M., Summers M.F. (2003). Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein, *Journal of Molecular Biology*, 327, vol 5, p. 1013-1020.

Tang C., Loeliger E., Luncsford P., Kinde I., Beckett D., Summers M.F. (2004). Entropic Switch Regulates Myristate Exposure in the HIV-1 Matrix Protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, vol 2, p. 517-522.

Terry L.J., Wentz S.R. (2009). Flexible Gates: Dynamic Topologies and Functions for FG Nucleoporins in Nucleocytoplasmic Transport, *Eukaryotic Cell*, 8, vol 12, p. 1814-1827.

Thenin-Houssier S., Valente S.T. (2016). HIV-1 Capsid Inhibitors as Antiretroviral Agents, *Current HIV Research*, 14, vol 3, p. 270-282.

Tobaly-Tapiero J., Bittoun P., Neves M., Guillemin M.-C., Lecellier C.-H., Puvion-Dutilleul F., Gicquel B., Zientara S., Giron M.-L., Thé H. de, Saïb A. (2000). Isolation and Characterization of an Equine Foamy Virus, *Journal of Virology*, 74, vol 9, p. 4064-4073.

Trott O., Olson A.J. (2010). AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, vol 2, p. 455-461.

Troyer J.L., VandeWoude S., Pecon-Slattery J., McIntosh C., Franklin S., Antunes A., Johnson W., O'Brien S.J. (2008). FIV Cross-Species Transmission: An Evolutionary Perspective, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, vol 1, p. 159-166.

Troyer R.M., Thompson J., Elder J.H., VandeWoude S. (2013). Accessory Genes Confer a High Replication Rate to Virulent Feline Immunodeficiency Virus, *Journal of Virology*, 87, vol 14, p. 7940-7951.

Twizerimana A.P., Scheck R., Becker D., Zhang Z., Wammers M., Avelar L., Pflieger M., Häussinger D., Kurz T., Gohlke H., Münk C. (2020). Cell Type-Dependent Escape of Capsid Inhibitors by Simian Immunodeficiency Virus SIVcpz, *Journal of Virology*, 94, vol 23, p. e01338-20.

Uhl E.W., Heaton-Jones T.G., Pu R., Yamamoto J.K. (2002). FIV Vaccine Development and Its Importance to Veterinary and Human Medicine: A Review: FIV Vaccine 2002 Update and Review, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90, vol 3, p. 113-132.

Urano E., Ablan S.D., Mandt R., Pauly G.T., Sigano D.M., Schneider J.P., Martin D.E., Nitz T.J., Wild C.T., Freed E.O. (2016). Alkyl Amine Bevirimat Derivatives Are Potent and Broadly Active HIV-1 Maturation Inhibitors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, vol 1, p. 190-197.

Van Drie J.H., Tong L. (2020). Cryo-EM as a powerful tool for drug discovery, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30, vol 22, p. 127524.

VandeWoude S., Troyer J., Poss M. (2010). Restrictions to cross species transmission of lentiviral infection gleaned from studies of FIV, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134, vol 1-2, p. 25.

Vecchio C.D., Celestino M., Celegato M., Palù G., Parolin C., Bouamr F., Calistri A. (2020). Alix-Mediated Rescue of Feline Immunodeficiency Virus Budding Differs from That Observed with Human Immunodeficiency Virus, *Journal of Virology*, 94, vol 11, p. e02019-19.

- Vergis E.N., Mellors J.W. (2000). NATURAL HISTORY OF HIV-1 INFECTION, *Infectious Disease Clinics of North America*, 14, vol 4, p. 809-825.
- Verschoor E.J., Hulskotte E.G., Ederveen J., Koolen M.J., Horzinek M.C., Rottier P.J. (1993). Post-Translational Processing of the Feline Immunodeficiency Virus Envelope Precursor Protein, *Virology*, 193, vol 1, p. 433-438.
- Vranken W.F., Boucher W., Stevens T.J., Fogh R.H., Pajon A., Llinas M., Ulrich E.L., Markley J.L., Ionides J., Laue E.D. (2005). The CCPN Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59, vol 4, p. 687-696.
- Wagner J.M., Zadrozny K.K., Chrustowicz J., Purdy M.D., Yeager M., Ganser-Pornillos B.K., Pornillos O. (2016). Crystal Structure of an HIV Assembly and Maturation Switch, *eLife*, 5, p. e17063.
- Wagner R.S., Kapinos L.E., Marshall N.J., Stewart M., Lim R.Y.H. (2015). Promiscuous Binding of Karyopherin $\beta$ 1 Modulates FG Nucleoporin Barrier Function and Expedites NTF2 Transport Kinetics, *Biophysical Journal*, 108, vol 4, p. 918-927.
- Wang L., Casey M.C., Vernekar S.K.V., Sahani R.L., Kankanala J., Kirby K.A., Du H., Hachiya A., Zhang H., Tedbury P.R., Xie J., Sarafianos S.G., Wang Z. (2020). Novel HIV-1 Capsid-Targeting Small Molecules of the PF74 Binding Site, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, p. 112626.
- Wang L., Casey M.C., Vernekar S.K.V., Sahani R.L., Kirby K.A., Du H., Zhang H., Tedbury P.R., Xie J., Sarafianos S.G., Wang Z. (2021). Novel PF74-like Small Molecules Targeting the HIV-1 Capsid Protein: Balance of Potency and Metabolic Stability, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11, vol 3, p. 810-822.
- Wang M., Quinn C.M., Perilla J.R., Zhang H., Jr R.S., Hou G., Byeon I.-J., Suiter C.L., Ablan S., Urano E., Nitz T.J., Aiken C., Freed E.O., Zhang P., Schulten K., Gronenborn A.M., Polenova T. (2017). Quenching Protein Dynamics Interferes with HIV Capsid Maturation, *Nature Communications*, 8, vol 1, p. 1779.
- Westman M.E., Malik R., Hall E., Harris M., Norris J.M. (2016). The Protective Rate of the Feline Immunodeficiency Virus Vaccine: An Australian Field Study, *Vaccine*, 34, vol 39, p. 4752-4758.
- Whitmore L., Wallace B.A. (2008). Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases, *Biopolymers*, 89, vol 5, p. 392-400.
- Williams R.L., Urbé S. (2007). The Emerging Shape of the ESCRT Machinery, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, vol 5, p. 355-368.
- Wong H.C., Shin R., Krishna N.R. (2008). Solution Structure of a Double Mutant of the Carboxy-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein, *Biochemistry*, 47, vol 8, p. 2289-2297.

Woodward C.L., Chow S.A. (2010). The Nuclear Pore Complex, *Nucleus*, 1, vol 1, p. 18-22.

Woodward C.L., Prakobwanakit S., Mosessian S., Chow S.A. (2009). Integrase Interacts with Nucleoporin NUP153 to Mediate the Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Journal of Virology*, 83, vol 13, p. 6522-6533.

Wright E.R., Schooler J.B., Ding H.J., Kieffer C., Fillmore C., Sundquist W.I., Jensen G.J. (2007). Electron Cryotomography of Immature HIV-1 Virions Reveals the Structure of the CA and SP1 Gag Shells, *The EMBO Journal*, 26, vol 8, p. 2218-2226.

Wu H., Wang W., Naiyer N., Fichtenbaum E., Qualley D.F., McCauley M.J., Gorelick R.J., Rouzina I., Musier-Forsyth K., Williams M.C. (2014). Single Aromatic Residue Location Alters Nucleic Acid Binding and Chaperone Function of FIV Nucleocapsid Protein, *Virus Research*, 193, p. 39-51.

Xu C., Fischer D.K., Rankovic S., Li W., Dick R.A., Runge B., Zadorozhnyi R., Ahn J., Aiken C., Polenova T., Engelman A.N., Ambrose Z., Rousso I., Perilla J.R. (2020). Permeability of the HIV-1 Capsid to Metabolites Modulates Viral DNA Synthesis, *PLoS Biology*, 18, vol 12, p. e3001015.

Xu Y., Zheng Y., Fan J.-S., Yang D. (2006). A New Strategy for Structure Determination of Large Proteins in Solution without Deuteration, *Nature Methods*, 3, vol 11, p. 931-937.

Zhang Z., Gu Q., Marino D., Lee K.-L., Kong I.-K., Häussinger D., Münk C. (2018). Feline APOBEC3s, Barriers to Cross-Species Transmission of FIV?, *Viruses*, 10, vol 4, p. 186.

Zhang Z., Gu Q., Vasudevan A.A.J., Hain A., Kloke B.-P., Hasheminasab S., Mulnaes D., Sato K., Cichutek K., Häussinger D., Bravo I.G., Smits S.H.J., Gohlke H., Münk C. (2016). Determinants of FIV and HIV Vif Sensitivity of Feline APOBEC3 Restriction Factors, *Retrovirology*, 13, vol 1, p. 1-23.

Zhao G., Perilla J.R., Yufenyuy E.L., Meng X., Chen B., Ning J., Ahn J., Gronenborn A.M., Schulten K., Aiken C., Zhang P. (2013). Mature HIV-1 Capsid Structure by Cryo-Electron Microscopy and All-Atom Molecular Dynamics, *Nature*, 497, vol 7451, p. 643-646.

Zhou L., Sokolskaja E., Jolly C., James W., Cowley S.A., Fassati A. (2011). Transportin 3 Promotes a Nuclear Maturation Step Required for Efficient HIV-1 Integration, *PLoS Pathogens*, 7, vol 8, p. e1002194.

Zhu F., Chen B. (2015). Monte Carlo Simulations of HIV Capsid Protein Homodimer, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55, vol 7, p. 1361-1368.

Zhuang S., Torbett B.E. (2021). Interactions of HIV-1 Capsid with Host Factors and Their Implications for Developing Novel Therapeutics, *Viruses*, 13, vol 3, p. 417.

---

## VII. Publications

---



Article

# Looking for Novel Capsid Protein Multimerization Inhibitors of Feline Immunodeficiency Virus

Natalia Sierra <sup>1</sup>, Christelle Folio <sup>2</sup>, Xavier Robert <sup>2</sup> , Mathieu Long <sup>2</sup>, Christophe Guillon <sup>2,\*</sup> and Guzmán Álvarez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 (km 363), Paysandú C.P. 60000, Uruguay; nataliasieraben@gmail.com

<sup>2</sup> Equipe Rétrovirus et Biochimie Structurale, Université de Lyon, CNRS, MMSB, UMR 5086 CNRS/Université de Lyon, IBCP, C.P. 69367 Lyon, France; folio.christelle@gmail.com (C.F.); xavier.robert@ibcp.fr (X.R.); mathieu.long@ibcp.fr (M.L.)

\* Correspondence: christophe.guillon@ibcp.fr (C.G.); guzmanalvarezlqo@gmail.com (G.Á.); Tel.: +33-(0)4-3765-2904 (C.G.); +598-9927-4984 (G.Á.)

Received: 17 May 2018; Accepted: 4 July 2018; Published: 10 July 2018



**Abstract:** Feline immunodeficiency virus (FIV) is a member of the retroviridae family of viruses. It causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in worldwide domestic and non-domestic cats and is a cause of an important veterinary issue. The genome organization of FIV and the clinical characteristics of the disease caused by FIV are similar to human immunodeficiency virus (HIV). Both viruses infect T lymphocytes, monocytes, and macrophages, with a similar replication cycle in infected cells. Thus, the infection of cats with FIV is also a useful tool for the study and development of novel drugs and vaccines against HIV. Anti-retroviral drugs studied extensively with regards to HIV infection have targeted different steps of the virus replication cycle: (1) disruption of the interaction with host cell surface receptors and co-receptors; (2) inhibition of fusion of the virus and cell membranes; (3) blocking of the reverse transcription of viral genomic RNA; (4) interruption of nuclear translocation and integration of viral DNA into host genomes; (5) prevention of viral transcript processing and nuclear export; and (6) inhibition of virion assembly and maturation. Despite the great success of anti-retroviral therapy in slowing HIV progression in humans, a similar therapy has not been thoroughly investigated for FIV infection in cats, mostly because of the little structural information available for FIV proteins. The FIV capsid protein (CA) drives the assembly of the viral particle, which is a critical step in the viral replication cycle. During this step, the CA protein oligomerizes to form a protective coat that surrounds the viral genome. In this work, we perform a large-scale screening of four hundred molecules from our in-house library using an in vitro assembly assay of p24, combined with microscale thermophoresis, to estimate binding affinity. This screening led to the discovery of around four novel hits that inhibited capsid assembly in vitro. These may provide new antiviral drugs against FIV.

**Keywords:** assembly inhibitors; immunodeficiency virus; microscale thermophoresis

## 1. Introduction

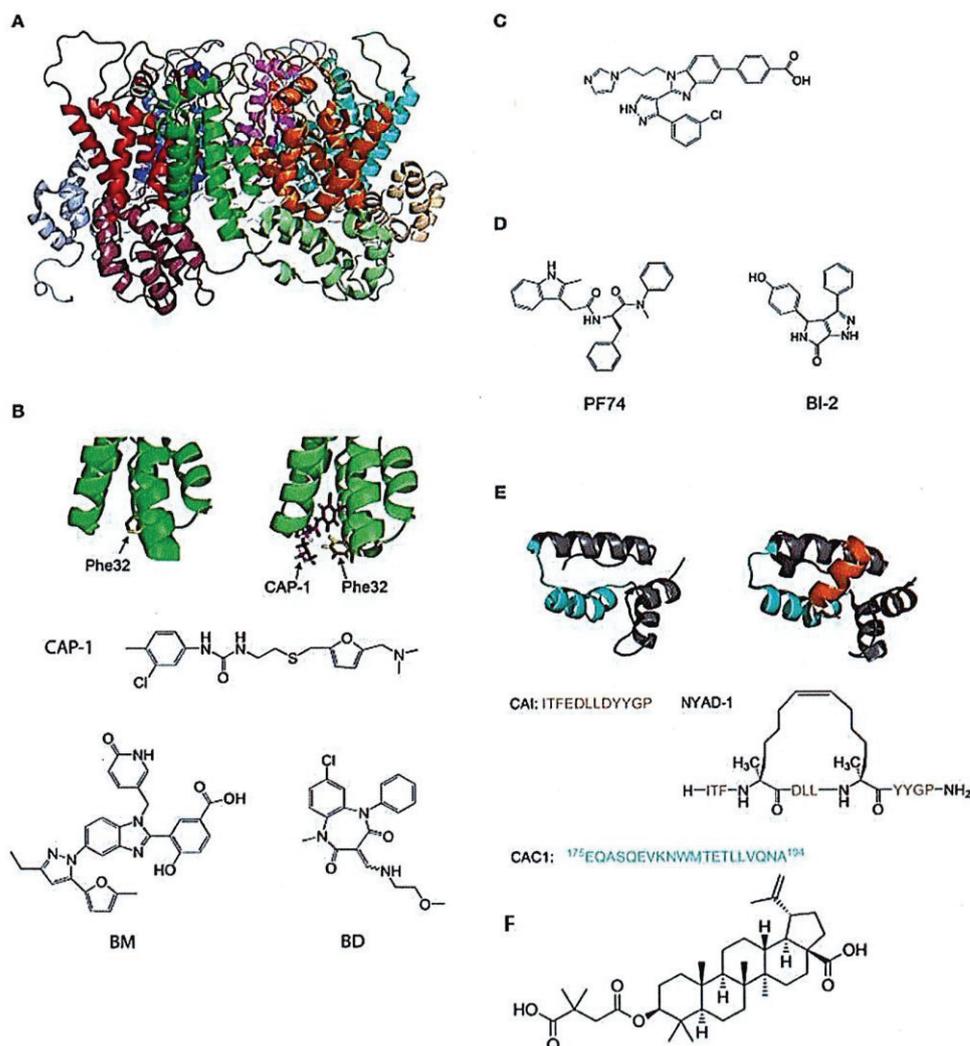
Since its first isolation in 1986, feline immunodeficiency virus (FIV) has been observed worldwide, and FIV infection remains a major health problem among cats, especially in countries with large populations of free-roaming cats [1]. FIV is a lentivirus which causes an immunodeficiency syndrome in cats and all the members of the *Felidae* family [2]. FIV closely resembles the human immunodeficiency virus (HIV) in its genomic, biochemical, and morphologic characteristics, as well as clinical and hematological manifestations [3]. As a result, FIV infection of domestic cats is dubbed “feline AIDS”

and is considered to be an excellent small animal model for testing prophylactic and therapeutic strategies against human AIDS [4]. A number of antiretroviral drugs for HIV-1, including the prototype nucleoside analogue 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), have been tested using the FIV model [5]. Several reports have described the in vitro inhibition of FIV by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors, such as AZT and 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine. Moreover, some 4-amino-3,6-disulphonato-1,8-naphthalimide derivatives, such as dextran sulphate, pradimicin A, heparin, phosphonoformate, 2'3'-dideoxythymidine, 2'3'-dideoxyadenosine, and 2'3'-dideoxyinosine, have also been shown to have in vitro activity against FIV in various assays [6]. However, to date, no efficient drug or vaccine for FIV infection has been brought to the market [7].

Recent progress in the combination therapy of several antiretroviral drugs, such as the highly active antiretroviral therapy, has achieved long-term control of HIV replication in vivo [8] and clinical outcome is improved when plasma viral burden is reduced [9]. In the treatment of humans with AIDS, specific targeting of HIV is important. Single-agent treatments are no longer recommended for the treatment of HIV-infected individuals because it promotes the rapid emergence of mutated HIV strains which become resistant to the antiviral agent. Highly active antiretroviral therapy of HIV-infected patients involves the administration of combinations of antiviral drugs from different drug classes, resulting in a slower occurrence of resistant strains [10]. To our knowledge, combination treatment with drugs from different drug classes has not been assessed in FIV-infected cats. This is mainly due to the fact that, despite similarities between the HIV-1 and FIV proteases, all but one of the currently available HIV-1 protease inhibitors failed to inhibit the protease of FIV [11] because of structural differences around the active site [12].

Virion assembly in lentiviruses is the result of a series of steps driven by the multimerization of the structural polyprotein Gag at the plasma membrane of the infected cell. Indeed, the intrinsic biological property of Gag to self-assemble into spherical virus-like particles both in cell cultures or in vitro systems is well documented [4,13,14]. Within the virion, the viral capsid is the protein shell that contains the viral ribonucleoprotein complex, which consists of genomic RNA, nucleocapsid protein, reverse transcriptase, and integrase. Being a lentivirus, lentiviral capsids are conical in shape and consist of a polymer of a single viral protein, the capsid protein (p24 or CA). As in the case of HIV, FIV is assembled as an immature particle, in which CA is released from the Gag polyprotein during proteolytic cleavage by the viral protease and maturation of the particles. After release, CA self-assembles to form the final closed conical structure [15]. Despite that, the CA of FIV represents an interesting therapeutic target which has not yet been exploited.

The viral capsid plays a crucial role in the first steps of the retroviral infection, including reverse transcription, entry to the nucleus, and integration. In HIV-1, most amino acid substitutions in CA that disrupt the structure and/or stability of the capsid are detrimental to the infection [16,17]. Several host factors interact with CA, and amino-acid substitutions or chemical inhibitors that disrupt these interactions can inhibit HIV infection [18,19]. For example, inhibitors of HIV-1 PF74 and BI-2 (Figure 1D) bind to a pocket between the N-terminal (NTD) and C-terminal (CTD) domains of CA and prevent interactions of the viral capsid with cellular proteins CPSF6 and Nup153 [20–23]. Additionally, compounds or peptides such as CAP-1 or NYAD-1 (Figure 1B,D), which prevent the formation of the mature functional viral capsid, inhibit the replication of the virus [23–25]. An interesting feature of the CA protein as a pharmacological target is its highly conserved sequence in the circulating strains of infected individuals, resulting in a low propensity to develop resistance [26,27]. On the other hand, the inhibitory effect of compound C (Figure 1C) can be reversed with a simple substitution of an amino acid at the N-terminal compound binding site of CA. Thus, the binding site in CA is important because some areas seem more vulnerable to mutations with the concomitant loss of binding to the compound [17]. In another way, inhibition of the capsid assembly acting on DNA control, as done by the drug Bevirimat, produces non-infective viral particles (Figure 1F) [9].



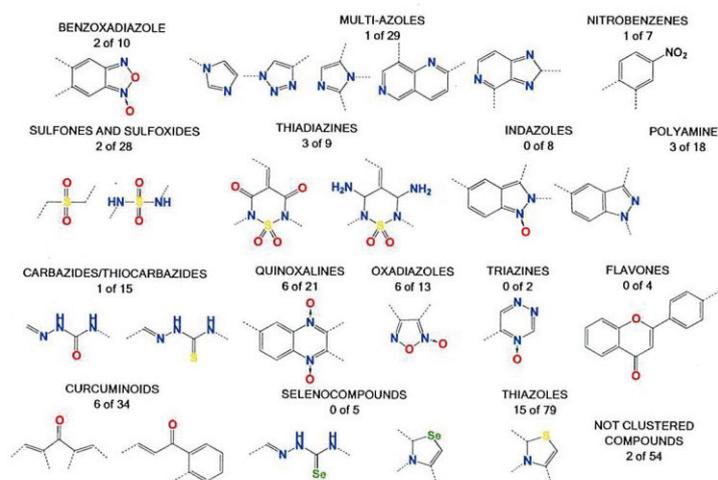
**Figure 1.** Molecules which inhibit the assembly of HIV-1 viral capsid [16]. (A) The structure of the hexamer of the HIV-1 CA protein (PDB ID: 1VUU). The different monomers are green, red, blue, magenta, cyan, and orange. The NTD and the CTD of each monomer are in different shades of the same color; (B) The structure of HIV-1 p24 NTD in the absence (left) and presence (right) of CAP-1. Phe32 is shown in yellow. CAP-1 is shown in magenta (PDB IDs: 1VUU and 2JPR); (C) Formula of the CA-binding compound described by Lemke et al. [26]; (D) Formula of the CA-binding compounds PF74 and BI-2; (E) Structure of the CA protein of HIV-1 CTD in the absence (left) and presence (right) of the capsid pool inhibitor (CAI, orange). The helix from which the CAC1 peptide was derived is cyan. The sequence of CAI and the structure of the optimized peptide NYAD-1 are given below (PDB IDs: 1AUM and 2BUO); (F) The structure of the Bevirimat [9].

In this work we performed a large screening of around four hundred molecules from our in-house library to identify leads of compounds blocking the assembly of FIV CA. We used an in vitro assembly assay of CA, combined with microscale thermophoresis, to estimate binding affinity, and we used docking studies to get a hint into the protein compounds interfaces. This led to the identification of several lead compounds which warrant further investigation for the development process of new anti-FIV drugs.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Our In-House Library

Most of the compounds tested in this study were synthesized previously as part of our ongoing program in drug development for the Chagas disease and other human diseases, such as cancer and aging disease. This resulted in a library containing, to date, more than 2000 compounds [28–30]. We selected some compounds which harbored structural similarity with the reported HIV-1 p24 assembly inhibitors, as well as compounds randomly selected to representing all of the chemical families present in our library (Figure 2). A database with all the compounds from our library was generated using the ChemOffice® 12.0 software package (Cambridge, MA, USA). Then, structural similarities with known HIV capsid inhibitors were estimated using the ChemFinder tool from ChemOffice®. For the selection process, we used a structural similarity criteria of 80% with the reported inhibitor of CA as a search filter (Supplementary Figure S1). As an example, this resulted in the identification of 18 molecules from our library which harbor 80% similarity with the CAP-1 HIV-1 inhibitor (Figure 1), from which the compound with the best score was selected [9,22–24,31–33]. The random selection of the other compounds was performed based on several criteria: abundance of the compound, solubility, cost-effective synthetic procedures, and compounds with toxicology data. The structural details of the selected molecules are in Table S1 (Supporting Information), with some examples in Figure 2, and include families like benzofuroxanes, furanes and thiophenes, 4-substituted-1,2,6-thiadiazines and its synthetic precursors, quinoxaline 1,4-dioxides, phenazine 5,9-dioxides, furoxanes, imidazole *N*-oxide, indazoles, thiazoles, 1,2,4-triazine *N*-oxides, flavonoids, nitroalkenes, and others.



**Figure 2.** Representation of the compound families used in this work. There are 15 clustered families and 54 compounds with high diversity of structures. The numbers below the families' names are the molecules with inhibitory effects in our assembly assay versus the total molecules of the family that we tested (see below). For example, we identified two molecules of the benzoxadiazole family which inhibit *in vitro* assembly out of the 10 molecules tested.

### 2.2. In Vitro Assembly Studies

To find novel chemical structures as a backbone for the design of new antiviral drugs targeting the capsid assembly of the virus, we optimized a CA assembly *in vitro* assay for screening purposes [34].

Indeed, our initial assay used light scattering and could only monitor the assembly of one sample per experiment on 40 min kinetics [35]. This resulted in using almost 20 mg of protein in a 14 h period to test 10 compounds, in duplicate, using light scattering, which was not adequate for screening methods. The use of the spectrometric technique to follow capsid assembly has been described for

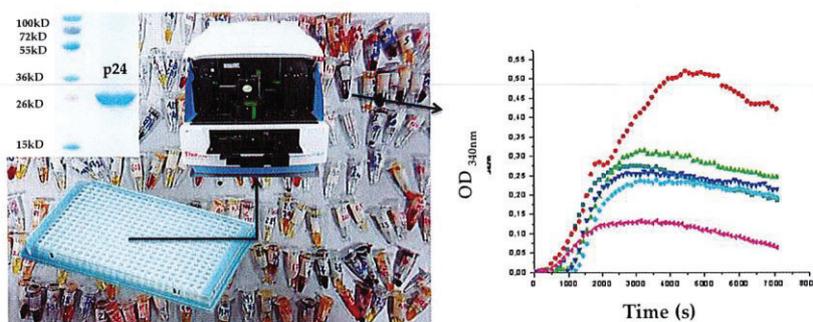
HIV [24] and is based on the detection of capsid assembly via the measurement of the increase of medium turbidity. The use of this technique to monitor FIV p24 assembly allowed us to use 384-well plates, reducing the volume of protein to 15  $\mu$ L per sample and allowing a testing of 10 compounds, in duplicate, in 40 min. Moreover, in this format, the protein concentration (5 mg/mL) was enough to start the assembly without needing the high concentration of salt used in the HIV in vitro assembly assay. High salt concentration could cause a problem by interfering with the solvation and solubility of some molecules and the loss of their interaction with the target. The only limitation of this method using low volumes was the risk of introducing air bubbles in the reaction, which interfere negatively in the absorbance measurement. However, this issue was solved by a careful manipulation in the filling process of the plates.

The most important limitations in screening our compounds in the assembly assay were the dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration. In the case of the CA assembly, the maximal concentration of DMSO was 0.25–0.5% *v/v*. This makes sense because the assembly process depends on a weak interaction of the protein surface. As DMSO is a surfactant, presence of DMSO might “solubilize” the CA monomers. However, this maximal DMSO concentration is too low for several lipophilic molecules, and many molecules could not be tested for that reason. To get better solubility, we replaced DMSO with glycerol for some compounds which, in some cases, was useful but was not sufficient to solubilize some compounds.

With this spectrometric assembly assay, we were able to discriminate two different behaviors for compounds interfering with the assembly of FIV CA: the enhancement of the assembly or its inhibition. The enhancement of assembly is associated with an increase of the diameter of the assembled objects and could result in a disordered or altered capsid with a loss of function. Inhibition is the classical effect which would impair the formation of the capsid (Figure 3).

The compounds were selected as an active compound when the inhibition of the assembly process was more than 40% at 50 or 25  $\mu$ M. The oxadiazoles family was the most active, with 50% of its members showing assembly inhibition activity. High nitrogen content heretocycles were not a good source of bioactive molecules. Some compounds with structural similarities with Bevirimat were also active, like some steroid compounds clustered in diverse families. The thiazoles family shows several active compounds, but these are highly diverse and do not show a structural correlation between them. On the other hand, compounds of the thiadiazine family showed active molecules with structures that are closely correlated. We could not find active molecules in four families (i.e., selenium containing compounds, flavones, triazines, and indazoles).

The dose response could not be calculated with this method. To confirm the interaction of our compound with FIV CA and get a dose response, we performed microscale thermophoresis (MST) to confirm the interaction of the active compounds and their affinity for CA.



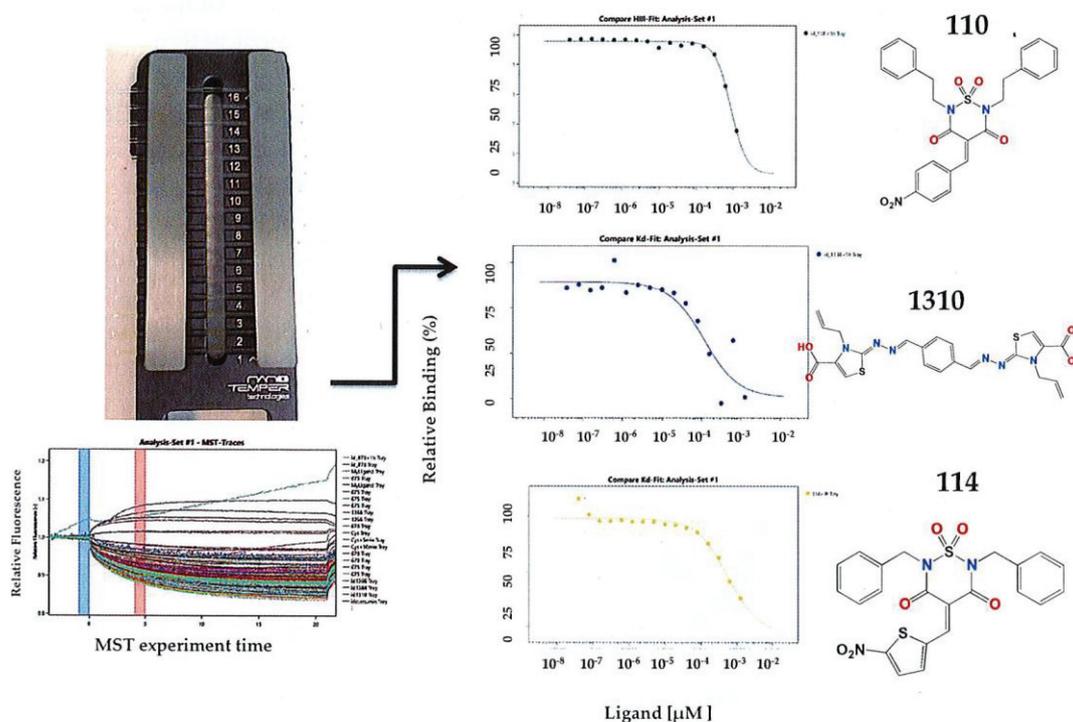
**Figure 3.** Left panel: general representation of the optimized screening in the assembly assay. Purity of p24 is shown in the inset. Right panel: two discriminable behaviors are visible compared to the control (in dark blue). In red is the enhancement of the process, and in pink is the inhibition of the process. The green and light blue curves are typical for compounds with no effect on the p24 assembly.

### 2.3. Microscale Thermophoresis Studies

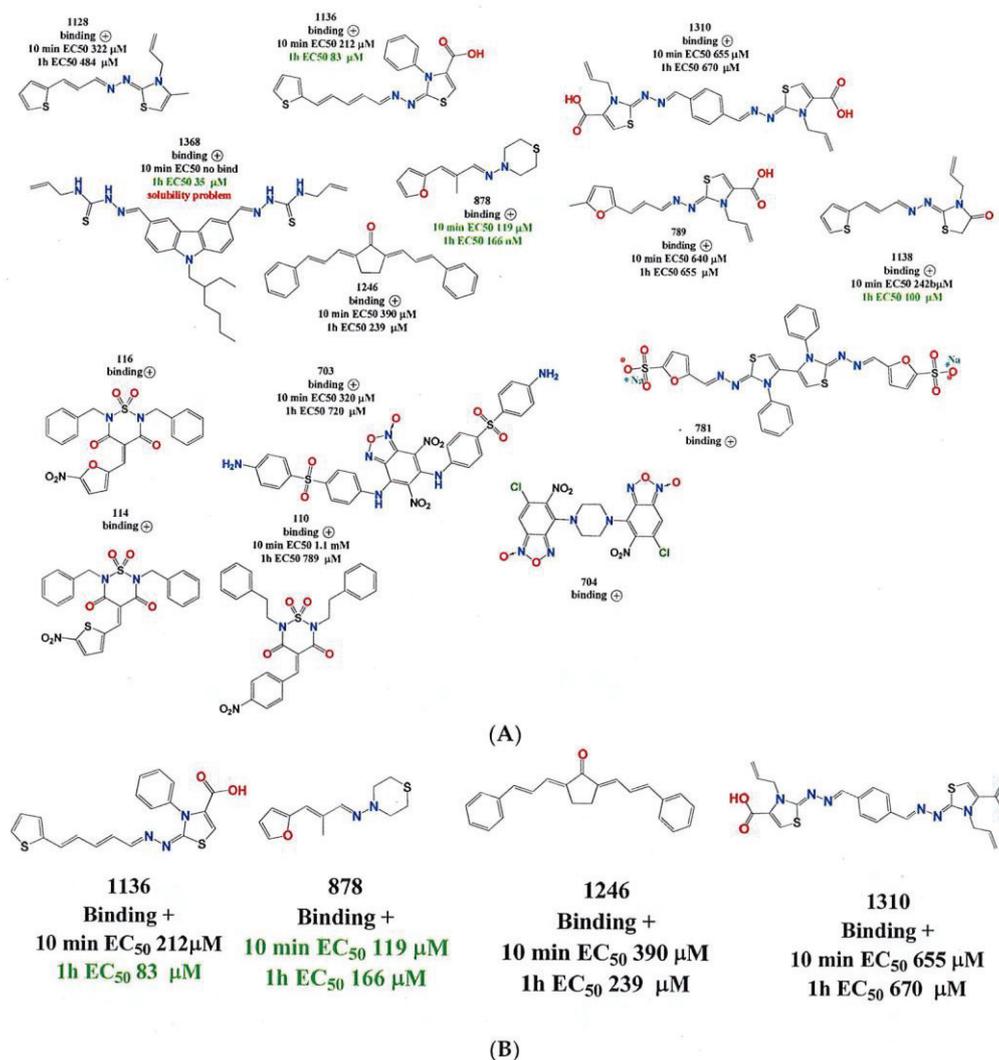
For the active compounds selected from the screening, we checked the binding affinity using MST (Figure 4). Microscale thermophoresis can cope with the presence of 5% of DMSO, resolving the solubility problems that we encountered in the assembly assay for some compounds. Another advantage of MST is that it uses low concentrations of protein (in the nanomolar range), which could be better in analyzing the interaction process because the compound/protein ratios were inverted compared to the assembly assay. The major disadvantage of this method is the interference of the compound with the measurement, either by autofluorescence or quenching. However, from the 48 active compounds which we identified by spectrometric methods, we confirmed using MST that 14 compounds bind to p24 (Figure 5).

We explored the binding affinity at two different times (10 and 60 min) to enhance the poetical interactions. There is a correlation between the time and the binding potency for some of the molecules. The most active compound was thiazole **1136** with an  $EC_{50}$  of 83  $\mu\text{M}$ , in comparison with the affinity of one of the first reported assembly inhibitor of HIV-1 compounds, CAP-1 ( $EC_{50} = 60 \mu\text{M}$ ), which was active in the in vitro infection assay with HIV-1 at 100  $\mu\text{M}$  [24].

A structure motif was repeated in some active molecules, such as carboxylic groups and sulfoxides, granting a further analysis of these families of molecules. These 14 compounds were validated again in our assembly assay by light scattering and spectrophotometry. From these, four molecules were validated with a binding affinity to CA and inhibition of the assembly: compounds **878**, **1136**, **1246**, and **1310** (Figure 5B). Also interestingly, these same molecules were used in the screening of five different enzymes from pathogen parasites but did not display inhibitory effects at 100  $\mu\text{M}$  [36,37], suggesting that our compounds are not unspecific interactors.



**Figure 4.** Left panel: schematic representation of the MST assay. It is the cassette with 16 capillary spaces to get 16 points in the doses response assay. On the right are some of the results obtained.

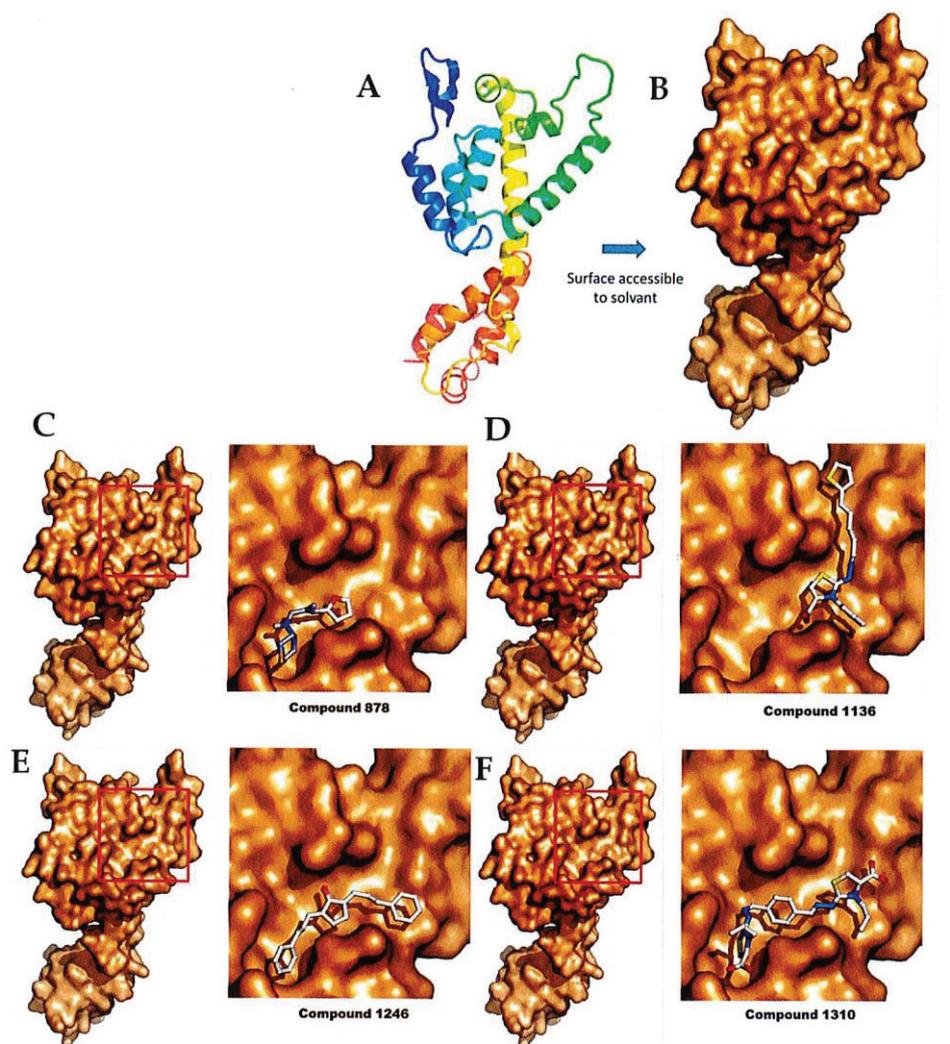


**Figure 5.** (A) Compounds binding to CA identified in the MST screening. With each structure are the binding data and the EC<sub>50</sub> values; (B) Verified hits in the polymerization assay.

#### 2.4. Docking Analysis

To study the different binding modes of these compounds, we performed some computational studies by docking. Surprisingly we found that the compounds bind on the same surface of the protein in the 25-Å-long ridge comprised between helices a4 and a7, although each compound showed a specific binding site. Although this surface is not directly involved in HIV assembly, it is close to the monomer:monomer interface in the published HIV CA hexamer (Figure 6) [38]. Moreover, a recent study identified residues of the FIV capsid, which are important for FIV capsid assembly and are located in helix 4. Although our compounds do not bind directly to these two residues, these compounds could change the conformation of this region upon binding, resulting in the inhibition of p24:p24 interactions during capsid assembly [39].

For each compound, the ten best docking positions were sorted based on their predicted  $\Delta G$  binding values. Interestingly, predicted  $K_D$  values deduced from the dockings are also in the  $\mu M$  range (Table 1). In particular, the  $K_D$  value of compound **1136** was predicted to be between 17 and 36  $\mu M$ , while showing an experimental value of 83  $\mu M$  when measured by MST (see above).



**Figure 6.** Representation of the CA monomer and the different docking studies from the selected compounds. (A) The monomer of CA in cartoons; (B) The CA surface accessible to the solvent, computed using PyMol. The best scored positions after docking on CA (left panel), with a close-up view (right panel) of the binding region (red square) for (C) compound 878; (D) compound 1136; (E) compound 1246; and (F) compound 1310.

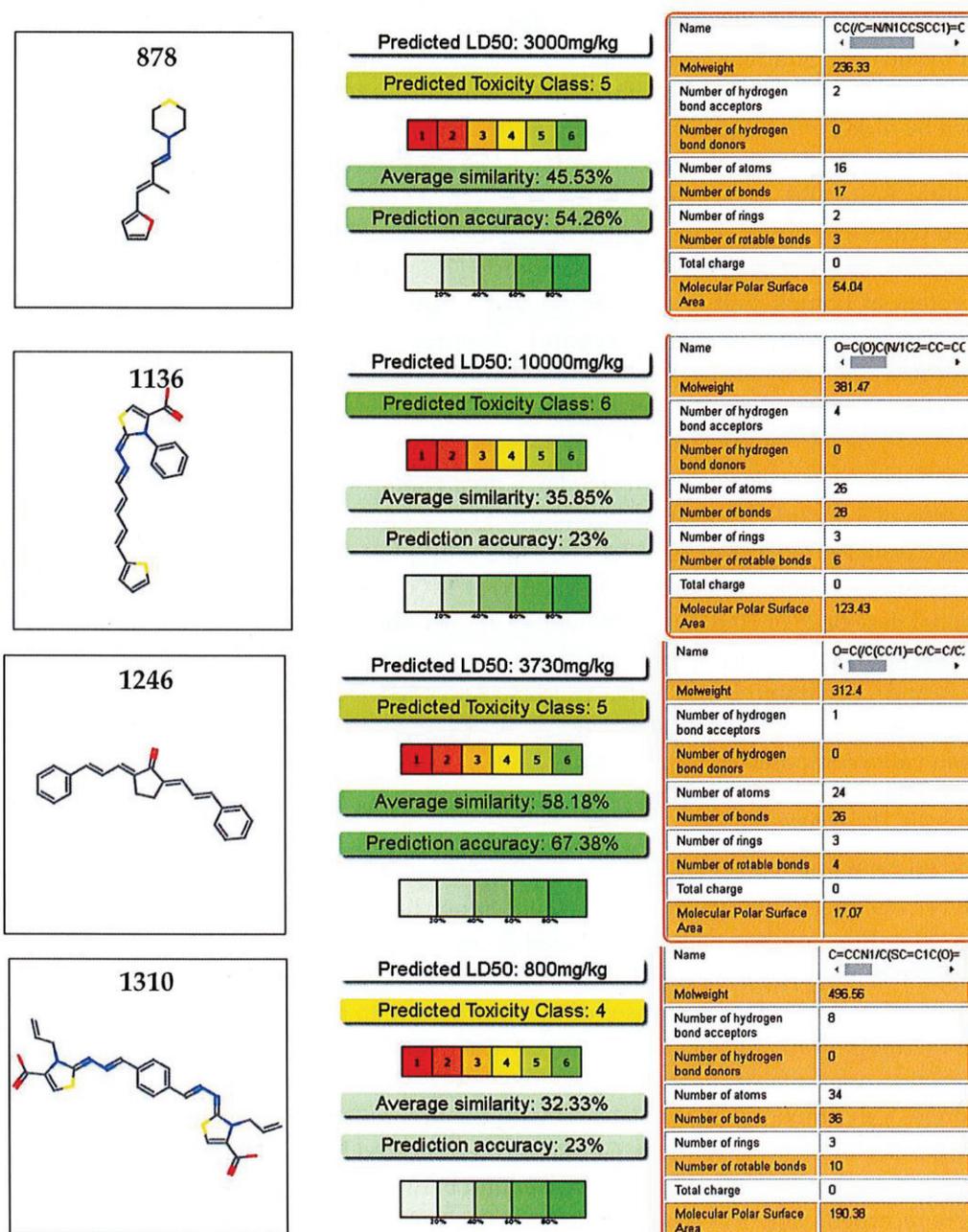
**Table 1.** Data from docking studies with the active compounds identified in the in vitro assay with CA.

Compounds	Predicted Binding $\Delta G$ (kcal·mol <sup>-1</sup> ) Range Values	Predicted KD ( $\mu$ M) Range Values
878	−5.2/−4.9	163/269
1136	−6.6/−6.1	17/36
1246	−7.4/−7.0	4/8
1310	−6.3/−6.0	26/43

### 2.5. Toxicology Data

We explored the toxicology profiles of the active molecules using an online predictor with a database of a hundred thousand molecules. Our selected molecules were considered safe drugs, as deduced from the prediction of the oral toxicity in mice (Figure 7). Cytotoxicity predictions of hepatic

toxicity and genotoxicity were also low for these molecules. In the case of **878** and **1246**, cytotoxicity predictions were corroborated by our previous work on these molecules, with a cytotoxicity in murine macrophages of  $IC_{50} > 100 \mu M$  [37]. Moreover, the four hits were assayed with two different type of mammalian cell at  $100 \mu M$ , without cytotoxic effect at this dose (Table S2) [29]. Compound **1246** was used in a murine acute infection model of the Chagas disease and was administrated at  $100 \text{ mg/kg}$  body weight for 15 days, without toxic effect during this period [28].



**Figure 7.** Toxicology profiles of the studied compound calculated from PROTOX (Charite University of Medicine Institute for Physiology Structural Bioinformatics Group Philipstrasse 12, 10115 Berlin, Germany) [40].

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Expression and Purification of CA

The FIV CA protein was expressed and purified mostly as described [35,39]. *Escherichia coli* cells (BL2I (DE3) pLysS, Lucigen, Middleton, WI, USA) transformed with pRSET-p24EDCP-T were grown in Lysogenic broth medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplemented with 50 mg/mL of ampicillin, at 37 °C. When cells reached an OD<sub>600</sub> value between 0.3 and 0.4, the expression of CA was induced by the addition of 1 mM isopropyl- $\alpha$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 3 h at 37 °C, then cells were harvested by centrifugation and the pellets were stored overnight at –20 °C. The purification of p24 protein was performed by nickel affinity chromatography, as described [40], using batch incubation with Ni<sup>2+</sup>-TED resin (Macherey-Nagel, Hoerd, France), followed by loading onto a gravity column. The column was washed three times with LEW buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8.5), and the elution was performed with LEW buffer containing 50 mM of imidazole. The concentration of CA was quantified by spectrophotometry at 280 nm, using a Nanodrop (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The purity of the protein at homogeneity was checked using SDS-PAGE analysis before further processing (Figure 3). Buffer exchange, using ultrafiltration devices (10 kD MWCO, Sartorius, Aubagne, France), was performed against a HEPES/NaCl Buffer (50 mM HEPES pH 6.5, 100 mM NaCl).

#### 3.2. Assembly Assay by Spectrophotometry [24]

The CA assembly assay was performed in a final volume of 50  $\mu$ L in 384-well plates, with a final concentration of 5 mg/mL of purified recombinant FIV p2 in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1 M NaCl, pH 7.4. Absorbance is measured at 340 nm every 30 s in a multiplate reader Varioskan<sup>TM</sup> Flash Multimode Reader (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Waltham, MA, USA) at 38 °C for 30 min. The compounds were tested at a fixed initial dose of 25 or 50  $\mu$ M (at 0.5% DMSO *v/v*) by adding 1  $\mu$ L of the concentrated ligand were added to the well before starting the measurement. The controls were CA at 5 mg/mL in only 0.5% DMSO *v/v* and CA without DMSO. The criteria to select active compounds were the observation of at least 50% of assembly inhibition at these doses, based on the reduction of the OD value at 340 nm at the plateau value compared to the controls.

#### 3.3. Microscale Thermophoresis [41]

MTS experiments were performed according to the NanoTemper technologies protocol in a Monolith NT.115 (green/blue) instrument (NanoTemper Technologies, München, Germany). With this technique, the diffusion behavior of a labeled protein is measured when an infrared light excites the movement of the protein in capillaries. This behavior is the combination of two effects: the fast, local environment dependent responses of the fluorophore to the temperature jump and the slower diffusive thermophoresis fluorescence changes. It will be modified when the protein is complexed with increasing amounts of unlabeled partners, leading to titration curves that can be fit for K<sub>d</sub> estimation [41]. In practice, CA was labeled with the Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA (NanoTemper Technologies, München, Germany), as described by the manufacturer. The experiments were performed using 20% and 40% MST power and between 20–80% LED power at 24 °C. The MST traces were recorded using the standard parameters: 5 s MST power off, 30 s MST power on, and 5 s MST power off. The compounds were used at high concentrations (around 5 mM) in the bindings check assay with DMSO at 5% *v/v*. If the binding check was positive, then the affinity determination was performed with the same experimental settings, with serial 2 $\times$  dilutions of the compound of interest.

#### 3.4. Docking

The crystal structure of the full-length FIV CA that we previously solved (PDB entry 5NA2) [40] was used as a target protein in the subsequent docking experiments. In this PDB entry, CA NTD and CA CTD domains are in a compact form, due to an artifactual intermolecular disulfide bond. In order

to obtain its open form, we used the hexameric crystal structure of the HIV-1 capsid protein CA as template (PDB entry 5HG9) [38]. CTD and NTD domains from FIV CA were superimposed to those of HIV-1, and the linker region (residues 137–141) was reconstructed manually using COOT [42], respecting the backbone and side-chains conformational restraints.

Compounds were modelled using the smiles code from the Chemoffice software. Then, CA in its open form and compounds were prepared using AutoDockTools v1.5.6 [43]. The polar hydrogen atoms were added, the non-polar hydrogens were merged, and the Gasteiger partial atomic charges were computed. Finally, all the possible rotatable bonds were assigned for each compound molecule.

A “blind docking” was then carried out with the program AutoDock Vina v1.1.2 [44]. Compounds were treated as flexible while the target protein was treated as rigid. The search space was defined in order to encompass the entire surface of the target protein, and a large exhaustiveness value of 1000 was used regarding the wide search space ( $76 \times 60 \times 44 \text{ \AA}^3$ ). A visual examination of the resulting docking poses was carried out using PyMOL 1.5 (Schrödinger, Delano Scientific, LLC, New York, NY, USA).

### 3.5. Cytotoxicity Assay in Mammalian Cells

Vero cell lines (ATCC, Rockville, MD, USA) were cultivated in Dulbecco’s modified Eagles medium (DMEM) with 10% FCS in a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Vero cells were seeded in 96-well plates at an initial density of  $5 \times 10^3$  cells per well. J774.1 murine macrophage cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in DMEM culture milieu containing 4 mM L-glutamine and supplemented with 10% FCS. The cells were seeded in a 96-well plate ( $5 \times 10^4$  cells in 200  $\mu$ L culture medium) and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 48 h, to allow cell adhesion prior to drug testing. Both cell lines were exposed for 48 h (at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>) to the compounds (100  $\mu$ M) or the solvent (0.4% DMSO) for the control, and additional controls (cells in medium) were used in each test. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by MTT reduction assays. To proceed with the MTT assay, 20  $\mu$ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 5 mg/mL solution dissolved in 1  $\times$  PBS was added to the wells and incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> controlled atmosphere. Next, the medium was aspirated and 100  $\mu$ L of DMSO was added to each well and incubated at room temperature in the dark for 15 min with moderate orbital shaking. Optical density (OD) was read in a plate spectrophotometer (Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode, Waltham, MA, USA) at 570 and 690 nm wavelengths. Each experiment was performed in triplicate. For the statistical analyses, the GraphPad Prism 6 was used. Dunnett’s multiple comparison tests and Student’s *T*-test were used when we compared the averages of each condition with the control [45].

## 4. Conclusions

In this work, we performed a large screening of 400 molecules from a large library of compounds, looking for new hits for antiretroviral drug development against the FIV assembly. For this, we optimized methods towards a cost-effective screening method for FIV assembly inhibitors. Then, we combined the complementary methods using the CA protein (i.e., assembly assay, MST, and docking), allowing the identification of four compounds which represent interesting leads for the design of CA assembly disrupters. Interestingly, these compounds also showed no cytotoxic effects in mammalian cells, thus representing interesting candidate molecules which will now be tested in in vitro infection assays with live viruses.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1424-8247/11/3/67/s1>, Table S1. Complete list of molecules assayed in the CA assembly. Table S2. Cytotoxicity assay in mammalian cells. Figure S1. Output of the search using ChemFinder from ChemOffice software.

**Author Contributions:** N.S. and C.F. performed expression and purification of protein and assembly assays, N.S. and M.L. performed the thermophoresis experiments, X.R. performed the docking analysis, C.G. and G.Á. designed and coordinated the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

**Funding:** ECOS-Sud program (Uruguay—France, action U14S01)

**Acknowledgments:** PEDECIBA Uruguay, CSIC Universidad de la República. This work was supported by the ECOS-Sud program (Uruguay—France, action U14501). We thank Pierre Soule (Nanotemper) and Roland Montserret (MMSB) for helpful advices with MST.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Schwartz, A.M.; McCrackin, M.A.; Schinazi, R.F.; Hill, P.B.; Vahlenkamp, T.W.; Tompkins, M.B.; Hartmann, K. Antiviral efficacy of nine nucleoside reverse transcriptase inhibitors against feline immunodeficiency virus in feline peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Vet. Res.* **2014**, *75*, 273–281. [CrossRef] [PubMed]
2. Mohammadi, H.; Bienzle, D. Pharmacological inhibition of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses* **2012**, *4*, 708–724. [CrossRef] [PubMed]
3. Yamamoto, J.K.; Sanou, M.P.; Abbott, J.R.; Coleman, J.K. Feline immunodeficiency virus model for designing HIV/AIDS vaccines. *Curr. HIV Res.* **2010**, *8*, 14–25. [CrossRef] [PubMed]
4. Luttge, B.G.; Freed, E.O. FIV Gag: Virus assembly and host-cell interactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *134*, 3–13. [CrossRef] [PubMed]
5. Hart, S.; Nolte, I. Long-Term Treatment of Diseased, FIV-Seropositive Field Cats with Azidothymidine (AZT). *J. Vet. Med. Ser. A* **1995**, *42*, 397–409. [CrossRef]
6. Smyth, N.R.; McCracken, C.; Gaskell, R.M.; Cameron, J.M.; Coates, J.A.; Gaskell, C.J.; Hart, C.A.; Bennett, M. Susceptibility in Cell Culture of Feline Immunodeficiency Virus to Eighteen Antiviral Agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, *34*, 589–594. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532645> (accessed on 17 May 2018). [CrossRef] [PubMed]
7. Hosie, M.; Techakriengkrai, N.; Bęczkowski, P.; Harris, M.; Logan, N.; Willett, B. The Comparative Value of Feline Virology Research: Can Findings from the Feline Lentiviral Vaccine Be Translated to Humans? *Vet. Sci.* **2017**, *4*, 7. [CrossRef] [PubMed]
8. Kashiwase, H.; Katsube, T.; Iida, K.; Komai, T.; Nishigaki, T. Investigation into the mode of action of R-91650, an arylpiperazinyl fluoroquinolone, on feline immunodeficiency virus replication inhibitory activity. *Arch. Virol.* **2000**, *145*, 859–869. [CrossRef] [PubMed]
9. Timilsina, U.; Ghimire, D.; Timalsina, B.; Nitz, T.J.; Wild, C.T.; Freed, E.O.; Gaur, R. Identification of potent maturation inhibitors against HIV-1 clade C. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27403. [CrossRef] [PubMed]
10. Grinsztejn, B.; Hosseinipour, M.C.; Ribaud, H.J.; Swindells, S.; Eron, J.; Chen, Y.Q.; Wang, L.; Ou, S.S.; Anderson, M.; McCauley, M.; et al. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: Results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 281–290. [CrossRef]
11. Hayes, K.A.; Wilkinson, J.G.; Frick, R.; Francke, S.; Mathes, L.E. Early suppression of viremia by ZDV does not alter the spread of feline immunodeficiency virus infection in cats. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1995**, *9*, 114–122. [CrossRef] [PubMed]
12. Li, M.; Morris, G.M.; Lee, T.; Laco, G.S.; Wong, C.H.; Olson, A.J.; Elder, J.H.; Wlodawer, A.; Gustchina, A. Structural studies of FIV and HIV-1 proteases complexed with an efficient inhibitor of FIV protease. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *38*, 29–40. [CrossRef]
13. Nowicka-sans, B.; Protack, T.; Lin, Z.; Li, Z.; Zhang, S.; Sun, Y.; Samanta, H.; Terry, B. Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 3956–3969. [CrossRef] [PubMed]
14. Tremblay, M.; Bonneau, P.; Bousquet, Y.; DeRoy, P.; Duan, J.; Duplessis, M.; Gagnon, A.; Garneau, M.; Goudreau, N.; Guse, I.; et al. Inhibition of HIV-1 capsid assembly: Optimization of the antiviral potency by site selective modifications at N1, C2 and C16 of a 5-(5-furan-2-yl-pyrazol-1-yl)-1H-benzimidazole scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7512–7517. [CrossRef] [PubMed]
15. Sundquist, W.I.; Kräusslich, H.G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006924. [CrossRef] [PubMed]
16. Gabizon, R.; Friedler, A.; Jahnke, W. Allosteric modulation of protein oligomerization: An emerging approach to drug design. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 9. [CrossRef] [PubMed]

17. Wang, W.; Zhou, J.; Halambage, U.D.; Jurado, K.A.; Jamin, A.V.; Wang, Y.; Engelman, A.N.; Aiken, C. Inhibition of HIV-1 Maturation via Small Molecule Targeting of the Amino-Terminal Domain in the Viral Capsid Protein. *J. Virol.* **2017**, *91*, e02155-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lee, K.; Ambrose, Z.; Martin, T.D.; Oztop, I.; Julias, J.G.; Vandegraaff, N.; Baumann, J.G.; Wang, R.; Takemura, T.; Shelton, K.; et al. Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe* **2011**, *7*, 221–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Price, A.J.; Fletcher, A.J.; Schaller, T.; Elliott, T.; Lee, K.E.; KewalRamani, V.N.; Chin, J.W.; Towers, G.J.; James, L.C. CPSF6 Defines a Conserved Capsid Interface that Modulates HIV-1 Replication. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Price, A.J.; Jacques, D.A.; Mcewan, W.A.; Fletcher, A.J.; Essig, S.; Chin, J.W.; Halambage, U.D.; Aiken, C.; James, L.C. Host Cofactors and Pharmacologic Ligands Share an Essential Interface in HIV-1 Capsid That Is Lost upon Disassembly. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Shi, J.; Zhou, J.; Shah, V.B.; Aiken, C.; Whitby, K. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *J. Virol.* **2011**, *85*, 542–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thenin-houssier, S.; Valente, S.T.; Sciences, M. HIV-1 capsid inhibitors as antiretroviral agents Suzie. *Curr. HIV Res.* **2017**, *14*, 270–282. [[CrossRef](#)]
23. Lamorte, L.; Titolo, S.; Lemke, C.T.; Goudreau, N.; Mercier, J.F.; Wardrop, E.; Shah, V.B.; Von Schwedler, U.K.; Langelier, C.; Banik, S.S.R.; et al. Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4622–4631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tang, C.; Loeliger, E.; Kinde, I.; Kyere, S.; Mayo, K.; Barklis, E.; Sun, Y.; Huang, M.; Summers, M.F. Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 1013–1020. [[CrossRef](#)]
25. Kortagere, S.; Madani, N.; Mankowski, M.K.; Schön, A.; Zentner, I.; Swaminathan, G.; Princiotta, A.; Anthony, K.; Oza, A.; Sierra, L.-J.; et al. Inhibiting Early-Stage Events in HIV-1 Replication by Small-Molecule Targeting of the HIV-1 Capsid. *J. Virol.* **2012**, *86*, 8472–8481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lemke, C.T.; Faucher, A.; Mason, S.W.; Bonneau, P. A novel inhibitor-binding site on the HIV-1 capsid N-terminal domain leads to improved crystallization via compound-mediated dimerization research papers. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2013**, *69*, 1115–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rihn, S.J.; Wilson, S.J.; Loman, N.J.; Alim, M.; Bakker, S.E.; Bhella, D.; Gifford, R.J.; Rixon, F.J.; Bieniasz, P.D. Extreme Genetic Fragility of the HIV-1 Capsid. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Aguilera, E.; Varela, J.; Birriel, E.; Serna, E.; Torres, S.; Yaluff, G.; DeBilbao, N.V.; Aguirre-López, B.; Cabrera, N.; DíazMazariegos, S.; et al. Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1328–1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Álvarez, G.; Varela, J.; Márquez, P.; Gabay, M.; Arias Rivas, C.E.; Cuchilla, K.; Echeverría, G.A.; Piro, O.E.; Chorilli, M.; Leal, S.M.; et al. Optimization of antitrypanosomatid agents: Identification of nonmutagenic drug candidates with in vivo activity. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3984–3999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Álvarez, G.; Martínez, J.; Varela, J.; Birriel, E.; Cruces, E.; Gabay, M.; Leal, S.M.; Escobar, P.; Aguirre-lópez, B.; De Gómez-puyou, M.T.; et al. Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *100*, 246–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Fader, L.D.; Landry, S.; Goulet, S.; Morin, S.; Kawai, S.H.; Bousquet, Y.; Dion, I.; Hucke, O.; Goudreau, N.; Lemke, C.T.; et al. Optimization of a 1,5-dihydrobenzo[*b*][1,4]diazepine-2,4-dione series of HIV capsid assembly inhibitors 2: Structure-activity relationships (SAR) of the C3-phenyl moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3401–3405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lemke, C.T.; Titolo, S.; von Schwedler, U.; Goudreau, N.; Mercier, J.-F.; Wardrop, E.; Faucher, A.-M.; Coulombe, R.; Banik, S.S.R.; Fader, L.; et al. Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6643–6655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Thenin-houssier, S.; De Vera, M.S.; Pedro-Rosa, L.; Brady, A.; Richard, A.; Konnick, B.; Opp, S.; Buffone, C.; Fuhrmann, J.; Kota, S.; et al. Ebselen, a Small-Molecule Capsid Inhibitor of HIV-1 Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 2195–2208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Obal, G.; Trajtenberg, F.; Carrion, F.; Tome, L.; Larrieux, N.; Zhang, X.; Pritsch, O.; Buschiazzi, A. Conformational plasticity of a native retroviral capsid revealed by X-ray crystallography. *Science* **2015**, *349*, 95–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Serrière, J.; Fenel, D.; Schoehn, G.; Gouet, P.; Guillon, C. Biophysical characterization of the feline immunodeficiency virus p24 capsid protein conformation and in vitro capsid assembly. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Alvarez, G.; Aguirre-Lopez, B.; Varela, J.; Cabrera, M.; Merlino, A.; Lopez, G.V.; Lavaggi, M.L.; Porcal, W.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; et al. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5767–5772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Álvarez, G.; Perdomo, C.; Coronel, C.; Aguilera, E.; Varela, J.; Aparicio, G.; Zolessi, F.R.; Cabrera, N.; Vega, C.; Rolón, M.; et al. Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules* **2017**, *22*, E709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jacques, D.A.; McEwan, W.A.; Hilditch, L.; Price, A.J.; Towers, G.J.; James, L.C. HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis. *Nature* **2016**, *536*, 349–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Folio, C.; Sierra, N.; Dujardin, M.; Alvarez, G.; Guillon, C. Crystal structure of the full-length feline immunodeficiency virus capsid protein shows an N-terminal  $\beta$ -hairpin in the absence of N-terminal proline. *Viruses* **2017**, *9*, E335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Drwal, M.N.; Banerjee, P.; Dunkel, M.; Wettig, M.R.; Preissner, R. ProTox: A web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Garcia-Bonete, M.J.; Jensen, M.; Recktenwald, C.V.; Rocha, S.; Stadler, V.; Bokarewa, M.; Katona, G. Bayesian Analysis of MicroScale Thermophoresis Data to Quantify Affinity of Protein:Protein Interactions with Human Survivin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Morris, G.; Huey, R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Trott, O.; Olson, A. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fort, R.S.; Mathó, C.; Geraldo, M.V.; Ottati, M.C.; Yamashita, A.S.; Saito, K.C.; Leite, K.R.M.; Méndez, M.; Maedo, N.; Méndez, L.; et al. Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Identification of a Potential Inhibitor of the FIV p24 Capsid Protein and Characterization of Its Binding Site

Mathieu Long, François-Xavier Cantrelle, Xavier Robert, Emmanuelle Boll, Natalia Sierra, Patrice Gouet, Xavier Hanouille, Guzmán I. Alvarez,\* and Christophe Guillon\*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>



Read Online

ACCESS |



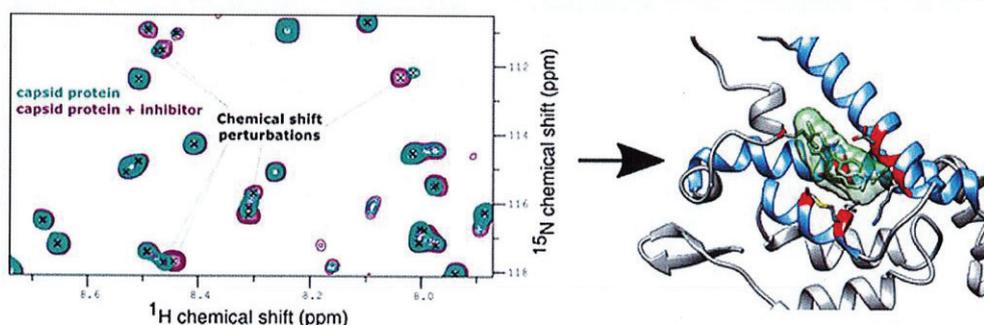
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



**ABSTRACT:** Feline immunodeficiency virus (FIV) is a veterinary infective agent for which there is currently no efficient drug available. Drugs targeting the lentivirus capsid are currently under development for the treatment of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). Here we describe a lead compound that interacts with the FIV capsid. This compound, **696**, modulates the *in vitro* assembly of and stabilizes the assembled capsid protein. To decipher the mechanism of binding of this compound to the protein, we performed the first nuclear magnetic resonance (NMR) assignment of the FIV p24 capsid protein. Experimental NMR chemical shift perturbations (CSPs) observed after the addition of **696** enabled the characterization of a specific binding site for **696** on p24. This site was further analyzed by molecular modeling of the protein:compound interaction, demonstrating a strong similarity with the binding sites of existing drugs targeting the HIV-1 capsid protein. Taken together, we characterized a promising capsid-interacting compound with a low cost of synthesis, for which derivatives could lead to the development of efficient treatments for FIV infection. More generally, our strategy combining the NMR assignment of FIV p24 with NMR CSPs and molecular modeling will be useful for the analysis of future compounds targeting p24 in the quest to identify an efficient treatment for FIV.

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus that can infect domestic cats and wild feline species.<sup>1,2</sup> Infected animals can develop an immunodeficiency syndrome similar to human acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), which is caused by infection with human immunodeficiency virus (HIV).<sup>1,3–5</sup> Since its discovery in 1987, FIV has been detected worldwide in domestic and wild feline species, and ≤10% of all domestic cats are thought to be infected.<sup>2,4,6</sup> A commercial vaccine, used only in North America, Australia, New Zealand, and Japan,<sup>7</sup> showed low efficacy against virus infectivity, and to date, no antiviral strategy has led to the efficient control of FIV viremia in infected animals.<sup>8,9</sup> Hence, there is a need for the development of efficient anti-FIV drugs, which must remain economically affordable not only for domestic veterinary practice but also for FIV epidemics in endangered wild feline species.<sup>10</sup>

In addition to its importance as a causative agent of feline AIDS, FIV has been thoroughly studied as a model of HIV-1 infection to test prophylactic and therapeutic antiretroviral

drugs and vaccines.<sup>11–14</sup> Strategies for repositioning efficient HIV-1 treatments to tackle FIV infection have also been studied to identify treatments suitable for these veterinary needs. For instance, nucleoside analogues, such as 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), have been tested as treatments of FIV infection.<sup>15–17</sup> However, none have proven to have sufficient treatment efficacy against FIV.<sup>8,17</sup> Therefore, FIV must be studied specifically to develop targeted treatments for use in veterinary medicine.

Lentiviruses are enveloped viruses that are characterized by a protein-based matrix below the membrane that protects the viral

Received: March 30, 2021

Revised: June 1, 2021

capsid containing the genome. The lentivirus genome is composed of a dimer of gRNA complexed with the nucleocapsid.<sup>18–21</sup> Lentiviral Gag and Gag-Pol polyproteins assemble at the membrane to form immature, non-infectious viral particles (HIV-1 Gag and FIV Gag, UniProtKB P04591 and P16087, respectively). This assembly occurs via the homotypic multimerization of the Gag polyprotein through its p24 region<sup>19,22</sup> to stabilize the Gag–RNA complexes<sup>23</sup> during gRNA encapsidation. After virus budding, the Gag polyproteins are cleaved by the viral protease, and several mature subunits are released, including the p24 subunit,<sup>20</sup> which then reorganize to generate the mature, infectious viral particles. The lentiviral capsid is composed of 1500–5000 copies of the p24 protein.<sup>23–27</sup> HIV-1 p24 protein has been shown to form hexamers and pentamers (capsomers) that subsequently assemble as a pseudoicosahedral, fullerene-shaped capsid core.<sup>28</sup> The same fullerene-shaped core is observed in FIV, suggesting that FIV p24 assembly is similar to that of HIV-1 p24.<sup>29</sup> Thus, p24 assembly appears to be a key step in the maturation of infectious FIV particles and thus in the FIV life cycle.

In addition to its role in the production of infectious virions, p24 assembly is critical for the post-entry processes of the lentivirus life cycle. Indeed, the viral capsid of HIV-1 has been shown to be required for the early stages of infection of a new cell, including the entry of the viral genome into the nucleus and reverse transcription.<sup>30–33</sup> The reverse transcription stage occurs inside the viral capsid, transforming the gRNA into a double-stranded viral DNA (dsDNA).<sup>30,34</sup> The capsid is transported to the nucleus via the cytoskeleton.<sup>35–37</sup> During its intracytoplasmic transport, the capsid must avoid the host cell's restriction factors. In lentiviruses, this escape is mediated by the interaction of lentiviral p24 proteins with cellular cyclophilin A (hCypA, UniProtKB P62937).<sup>38</sup> Capsid disassembly is then required for the efficient release of the viral dsDNA and its integration into the host cell's genome. While it is not completely clear whether this uncoating occurs in the nucleus or in the cytoplasm, recent experiments have revealed the presence of the capsid inside the nucleus.<sup>30,34,39,40</sup> The HIV-1 p24 subunit is also involved in interactions with other cellular proteins, such as nucleoporins Nup153 and Nup358 and the cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 (CPSF-6)<sup>33,41–44</sup> (hNup153, hNup358, and hCPSF6, UniProtKB P49790, P49792, and Q16630, respectively). These cellular proteins are involved in both the transport of the capsid from the basal membrane to the nucleus and nuclear import. Therapeutic drugs targeting the capsid have been developed for their ability to impair the assembly process, prevent interactions with cellular partners required for HIV-1 infectivity, or prevent capsid uncoating.<sup>45–49</sup>

In HIV-1, most mutations that affect the structure or stability of HIV-1 p24 assembly decrease infectivity.<sup>50</sup> Hence, drugs targeting the capsid seem promising as efficient treatments due to the limited adaptive capacities of p24. Therefore, compounds inhibiting the assembly, uncoating, and/or interactions between the capsid and the cellular partners mentioned above are currently under study for their impact on HIV-1 infectivity, for example, PF74 and its derivatives, which target the nucleoporin- or CPSF-6-binding sites.<sup>33,41,49,51,52</sup>

Currently, there are no effective drugs to treat FIV.<sup>5</sup> Moreover, reference compounds targeting HIV-1 assembly, such as PF74, do not inhibit FIV replication *in vitro*.<sup>53</sup> However, the identification of compounds inhibiting the function of FIV

p24 is still anticipated. To identify molecules that interfere with FIV p24 capsid assembly, we performed *in vitro* assembly assays and screened approximately 400 compounds from our in-house chemical library, as previously described.<sup>54</sup> This screening led to the identification of one promising lead compound, **696**. Microscale thermophoresis (MST) results revealed that **696** specifically binds p24, whose binding site was identified at the molecular level using liquid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. For this purpose, we performed the first NMR resonance assignments of FIV p24 and then conducted chemical shift perturbation (CSP) experiments to characterize the binding site for **696** on p24. These experimental data were used to model the interaction between **696** and FIV p24 through molecular docking experiments. This model suggested a stabilizing role for **696** on FIV p24 assembly, which we were able to demonstrate *in vitro*. Taken together, this characterization of compound **696** paves the way for the identification of additional FIV capsid inhibitors that could ultimately lead to the development of an anti-FIV drug.

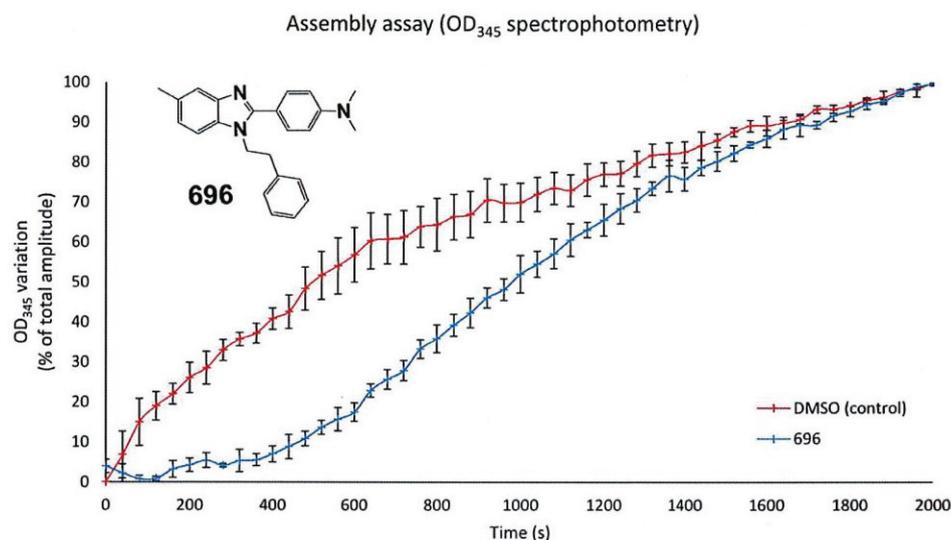
## ■ MATERIALS AND METHODS

**Unlabeled Protein Production.** Bacterial lysis, protein purification, and tag removal were performed using the full-length FIV p24 vector, as described previously,<sup>29</sup> except that the storage buffer was phosphate buffer (pH 6.8) containing 50 mM NaCl.

**In Vitro Assembly/Disassembly Assay.** The assembly of p24 was performed and monitored, as previously described.<sup>54</sup> Assembly was triggered using a 1:1 (v/v) mix of 7 mg/mL purified protein in 50 mM NaP<sub>i</sub> buffer (pH 7.4) containing 1 M NaCl in a final volume of 50  $\mu$ L. The optical density at 345 nm was measured every 40 s using the Infinite M1000 multiplate reader (Tecan) at 38 °C for 35 min. Compounds from our in-house library, which have been described elsewhere,<sup>54</sup> were tested at a concentration of 200  $\mu$ M [corresponding to a final concentration of 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO)] by adding 0.5  $\mu$ L of a 20 mM solution of compounds to the wells before the experiment was started. The control corresponded to 1% DMSO.

Compound **696** was synthesized, as described in the Supporting Information (Scheme S1). End-point samples from the *in vitro* assembly assay in the presence of either compound **696** or 1% DMSO (control) were used for the disassembly assay. Briefly, these samples were centrifuged at 20000g for 20 min at room temperature and resuspended in 400  $\mu$ L of low-salinity buffer (50 mM NaCl). Aliquots were sampled immediately after resuspension ( $t_0$ ) and after 8, 24, or 32 h. Aliquots were centrifuged immediately after sampling at 20000g for 20 min at room temperature, and the pellets were collected and analyzed using 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Gels were stained using Instant Blue reagent (Expedeon). Gel images were acquired using a Fusion Fx camera (Vilber).

**MST.** MST experiments were performed as previously described.<sup>54</sup> Briefly, we measured with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies) the diffusion of the fluorescently labeled protein in capillaries when the temperature was increased by 1 °C using an infrared light. The diffusion properties of the fluorescent protein will be modified upon binding of **696**, allowing the estimation of the affinity by titration with serial dilutions of the compound. For this purpose, His-tagged proteins were labeled following the supplier's protocol (NanoTemper Technologies) using the Monolith His-Tag



**Figure 1.** FIV p24 assembly in the absence or presence of compound **696**. The chemical structure of **696** is shown at the top left corner of the graph. Each curve displays the mean of three experiments, with error bars representing standard deviations.

RED-tris-NTA Labeling kit (NanoTemper).<sup>55</sup> The experiments were carried out at 40% MST power and 60% LED power at 37 °C. The compound was tested using serial 2-fold dilutions, resulting in a concentration range from 1 mM to 31 nM.  $K_d$  estimation (averaging of data points and curve fitting using the  $K_d$  model) was automatically calculated from the measured MST traces using the manufacturer's software (MO. Affinity Analysis 3).

**Singly Labeled <sup>15</sup>N Protein.** *Escherichia coli* bacteria (T7 Express Competent *E. coli* strain, New England Biolabs) were transformed with pRSET-p24EΔCP-T, as previously described.<sup>56</sup> One colony was grown overnight in lysogenic broth (LB) medium at 37 °C. The inoculation was performed using 20 mL of this preculture per liter of culture. The LB preculture volume used for inoculation was centrifuged for 5 min at 6000g and room temperature to pellet the bacteria; the LB supernatant was removed, and bacteria were resuspended in M9 minimal medium containing 4 g/L glucose, 1× MEM vitamins, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 μM CaCl<sub>2</sub>, 6 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L NaCl, 0.5 g/L ISOGRO-<sup>15</sup>N Powder-Growth medium (all supplied by Sigma-Aldrich), and 1 g/L <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (Euriso Top). Media were supplemented with ampicillin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 50 μg/L. After inoculation, bacteria were grown at 37 °C until the OD<sub>600</sub> reached 0.4; protein expression was induced using 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (Sigma-Aldrich). Bacterial cells were then grown overnight at 25 °C and centrifuged for 5 min at 6000g and room temperature. Pellets were stored at −20 °C until they were used.

**Triply Labeled <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, D Protein.** Bacteria were grown as described above for singly labeled protein but in M9 medium prepared using D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), deuterated ISOGRO-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N,D (Sigma-Aldrich), and 2 g/L D-glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-1,2,3,4,5,6,6-*d*<sub>7</sub> (Euriso Top). Preculture and culture were performed, as described above, except the inoculation in M9 medium that was performed with the preculture to reach a final OD<sub>600</sub> of 0.1.

**Bacterial Lysis.** Bacteria were lysed by sonication (40% power, 2 min cycles) on ice at least three times until the medium

was not viscous. Cell debris was then pelleted using centrifugation for 20 min at 11000g and 4 °C, and supernatants were purified using affinity chromatography.

**Protein Purification.** We performed affinity chromatography for 6×His-tagged proteins using the Ni-TED resin (Macherey-Nagel) and removed the His tag using Factor Xa, as previously described.<sup>56</sup> The protein was then concentrated using a Vivaspin 20 centrifugal concentrator [10000 molecular weight cutoff; poly(ether sulfone), Sartorius Stedim Lab Ltd.] and stored in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing 50 mM NaCl, and 2 mM DTT for the triply labeled protein. The protein concentration was assessed using a Nanodrop instrument (Thermo Fisher Scientific). The protein solution was supplemented with D<sub>2</sub>O at a final concentration of 5%. We used samples at a final concentration of 2.8 mg/mL (120 μM) for the triply labeled protein for NMR assignment and 2.2 mg/mL (92 μM) for CSP analysis.

**NMR Acquisition and Data Processing.** A 300 μL aliquot of the labeled p24 sample (120 μM) was placed in 5 mm Shigemi tubes. All NMR spectra were recorded at 293 K using an AvanceNeo Bruker 900 MHz spectrometer equipped with a CPTCI cryoprobe. The sequence-specific backbone assignment was based on two-dimensional (2D) TROSY <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N and three-dimensional (3D) BEST-TROSY HNCOC, BEST-TROSY-HN(CA)CO, BEST-TROSY-HNCACB, BEST-TROSY-HN(CO)CACB, BEST-TROSY-HNCA, BEST-TROSY-HNCOCA, and TROSY-HNCANNH pulse sequences. The proton chemical shifts were referenced using the sodium 3-trimethylsilyl[2,2,3,3-*d*<sub>4</sub>]propionate signal at 0 ppm. Data were transformed and processed using NMRPipe<sup>57</sup> and qMDD for acquisition with non-uniform sampling<sup>58</sup> and analyzed using CCPN Analysis Suite software.<sup>59</sup>

For the determination of CSPs, we used <sup>15</sup>N-labeled protein samples (2.2 mg/mL, 90 μM). We acquired HSQC spectra with samples containing compound **696** at a final concentration of 200 μM. Briefly, we added the required volume of the compound stock solution diluted in deuterated DMSO (DMSO-*d*<sub>6</sub>), or DMSO-*d*<sub>6</sub> alone as a control, representing 3.3

C

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX

$\mu\text{L}$  in a 330  $\mu\text{L}$  protein sample (final concentration of 1% DMSO).

Combined  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  CSPs were calculated for each peak using the formula  $\text{CSP} = \sqrt{(\delta^1\text{H})^2 + \frac{\omega_{\text{N}}}{\omega_{\text{H}}}(\delta^{15}\text{N})^2}$  with  $\delta^1\text{H}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  being the chemical shift displacements with and without the tested compounds, respectively, and  $\omega_{\text{H}}$  and  $\omega_{\text{N}}$  as the spectral widths of  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$ , respectively, yielding the equation  $\text{CSP} = \sqrt{(\delta^1\text{H})^2 + 0.237(\delta^{15}\text{N})^2}$ .

**Molecular Docking and Visualization.** We used Chimera software (University of California, San Francisco) to render the molecular structures,<sup>60</sup> while molecular surfaces were plotted using the MS/MS tool of the software.<sup>61</sup>

The monomeric crystal structure of p24 [Protein Data Bank (PDB) entry SNA2<sup>56</sup>] was used as the target in the docking experiment. Compound **696** was modeled in three dimensions using its smiles code produced by ChemDraw (PerkinElmer Informatics). Both p24 and **696** were then prepared using AutoDockTools (version 1.5.6).<sup>62</sup> The polar hydrogen atoms were added, the nonpolar hydrogens merged, and the Gasteiger partial atomic charges computed.

Docking was carried out using AutoDock Vina (version 1.1.2).<sup>63</sup> Compound **696** was treated as fully flexible, while target protein p24 was treated as rigid, with the exception of some residue side chains that were selected in an extended perimeter around the surface binding site identified by NMR, namely, Leu 30, Phe 39, Thr 49, Met 51, Ile 55, Met 56, Cys 61, Asp 64, Lys 65, Glu 66, Ile 67, Leu 68, Asp 69, Glu 70, Leu 72, Lys 73, Thr 76, Asp 80, Met 100, Ile 102, Cys 121, Tyr 125, and Leu 129. The docking grid box was positioned to cover this area, and a large exhaustiveness value of 500 was used to maximize the thoroughness of the search. A visual examination of the best docking poses was performed using PyMOL (Schrodinger, LLC).

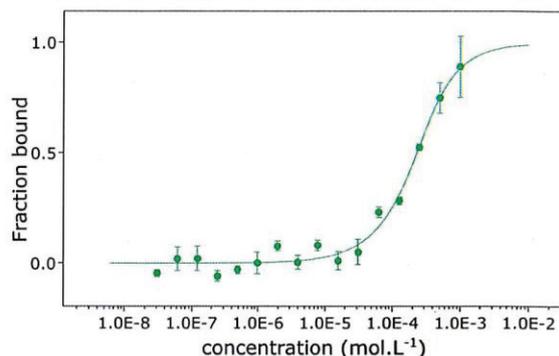
We finally used LigPlot+ (version 2.2)<sup>64</sup> to determine the residues involved in the predicted protein–compound complex and the nature of the interactions (i.e., hydrogen bonds and unbound contacts).

## RESULTS

**Screening and Identification of a Specific Compound Interfering with FIV Capsid Assembly *In Vitro*.** The screening of 400 compounds from our in-house chemical library using a spectrophotometric *in vitro* assembly assay<sup>54,65</sup> identified a compound, **696**, that belonged to the chemical series of benzimidazole compounds, which delayed capsid assembly (Figure 1).

Hence, this compound interferes with capsid assembly. To confirm the specificity of the interaction, MST experiments were performed by titrating serial dilutions of **696** against 200 nM fluorescently labeled FIV p24. These experiments revealed an estimated affinity of the lead compound **696** for p24 of  $101 \pm 35 \mu\text{M}$  (Figure 2).

**NMR Assignment of FIV p24.** Because the direct binding of **696** was confirmed by MST, we focused on the identification of its binding site on p24. To this end, we used liquid-state NMR spectroscopy. We used truncated protein p24E $\Delta$ CP-T for which the structure was previously determined using X-ray crystallography.<sup>56</sup> The p24 concentration was maintained at 2.8 mg/mL (120  $\mu\text{M}$ ) to avoid dimerization or oligomerization of the protein<sup>29</sup> during the NMR acquisition experiments. Using a triply labeled  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , D FIV p24 sample, we obtained a good-



**Figure 2.** Affinity of p24 for **696** measured by MST. Data points represent the mean of three experiments with error bars corresponding to standard deviations. The curve was plotted automatically using analysis software.

quality 2D  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum using a 900 MHz NMR spectrometer (Figure 3).

As no NMR data were available in the literature for FIV p24, we had to perform the NMR assignment. Thus, we collected the complete NMR data set on triply labeled  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , D FIV p24 samples from 3D  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ – $^{13}\text{C}$  HNCOC, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, and HN(CA)NNH spectra during the sequential assignment process, which was performed using the CcpNmr software<sup>59</sup> (Figure S1).

The NMR assignment of FIV p24 (Figure 3) was deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (entry S0794). This assignment covers 167 of the 201 non-proline residues (83% coverage) from the p24 sequence (Figure 4A,B). The missing assignments correspond to regions of the protein for which the signal:noise ratio was of low quality, including residues located in a proline-rich loop (residues Pro 84–Phe 94) as well as part of helices  $\alpha 4$  and  $\alpha 7$  (Figure 4C). Using the experimental  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts, we characterized the secondary structure of p24 in solution, which is in complete agreement with the crystal structure,<sup>56</sup> thereby confirming the quality of our NMR data (Figure 4D).

**CSP Analysis upon Binding of Compound 696.** To identify the binding site for the compound in p24, we performed an NMR CSP analysis. For this purpose, we compared the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of [ $^{15}\text{N}$ ]p24 samples in the absence (control with 1% DMSO- $d_6$ ) and presence of compound **696** (200  $\mu\text{M}$ , representing a final DMSO- $d_6$  concentration of 1%) and calculated the combined  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  CSPs induced upon binding of the compound (Figure 5). CSPs were observed for a limited set of resonances in which most of the peaks were unaffected; these findings were compatible with a well-defined binding site in p24 (Figure 5).

After quantification of the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  combined CSPs upon binding of compound **696** at 200  $\mu\text{M}$ , 21 resonances in the  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum, corresponding to 21 p24 residues, displayed a CSP higher than 2 times the standard deviation (SD), including 11 peaks with CSPs greater than  $3 \times \text{SD}$ . Nine amino acid residues with the highest CSPs colocalized in a defined area in the N-terminal domain (Figure 6A,B), which were mainly located in helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 7$  (Figure 6B). These amino acids define the binding site on the surface of the N-terminal domain of p24 (Figure 6C).

D

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX



**A)**

Category	Type NH	Type HN	Type CO	Type C $\alpha$	Type C $\beta$	All residues
Available	213	200	213	213	204	213
Assigned	167	167	185	185	154	187
% Assigned	78%	84%	87%	87%	75%	88%

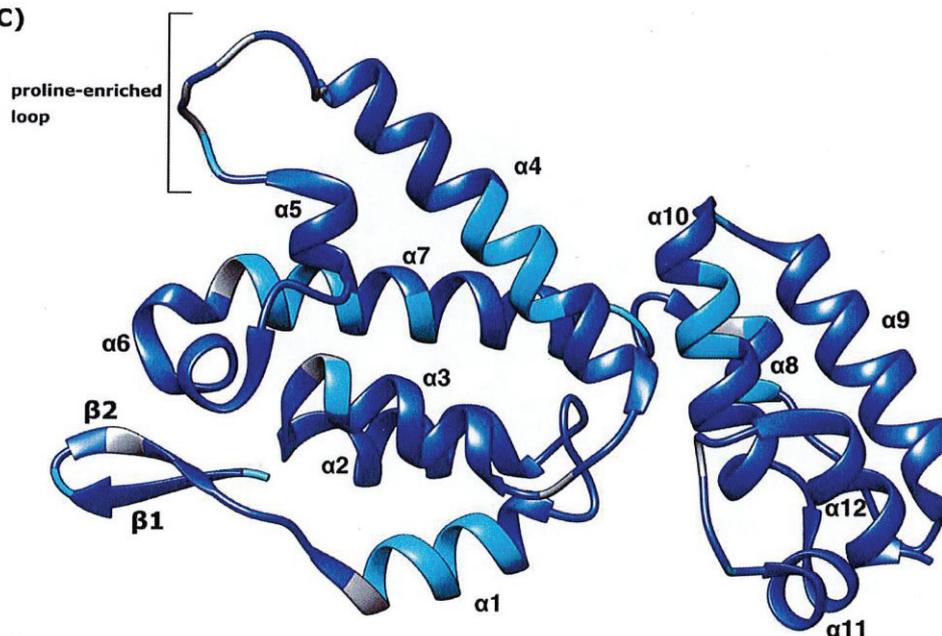
**B)**

```

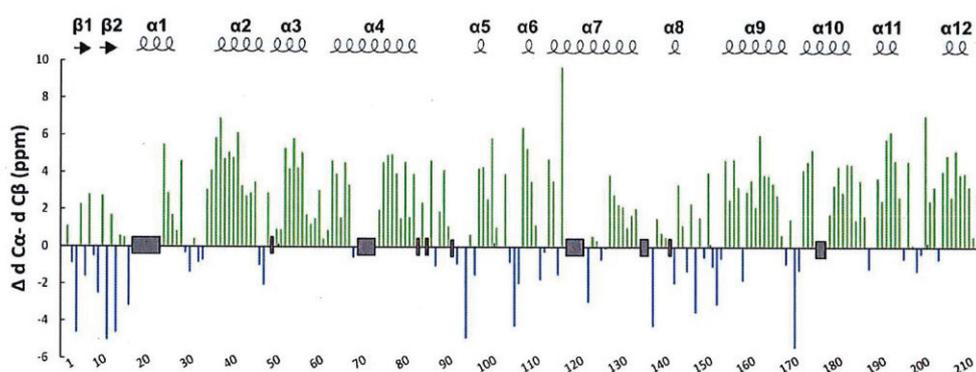
1  T I Q T V N G V P Q Y V A L D P K M V S I F M E K A R E G L G G E E V Q L W F T A F S A N L T P T D
51  M A T L I M A A P G C A A D K E I L D E S L K Q L T A E Y D R T H P P D A P R P L P Y F T A A E I M
101 G I G L T Q E Q Q A E A R F A P A R M Q C R A W Y L E A L G K L A A I K A K S P R A V Q L R Q G A K
151 E D Y S S F I D R L F A Q I D Q E Q N T A E V K L Y L K Q S L S I A N A N A D C K A M S H L K P E
201 S T L E E K L R A C Q E I

```

**C)**



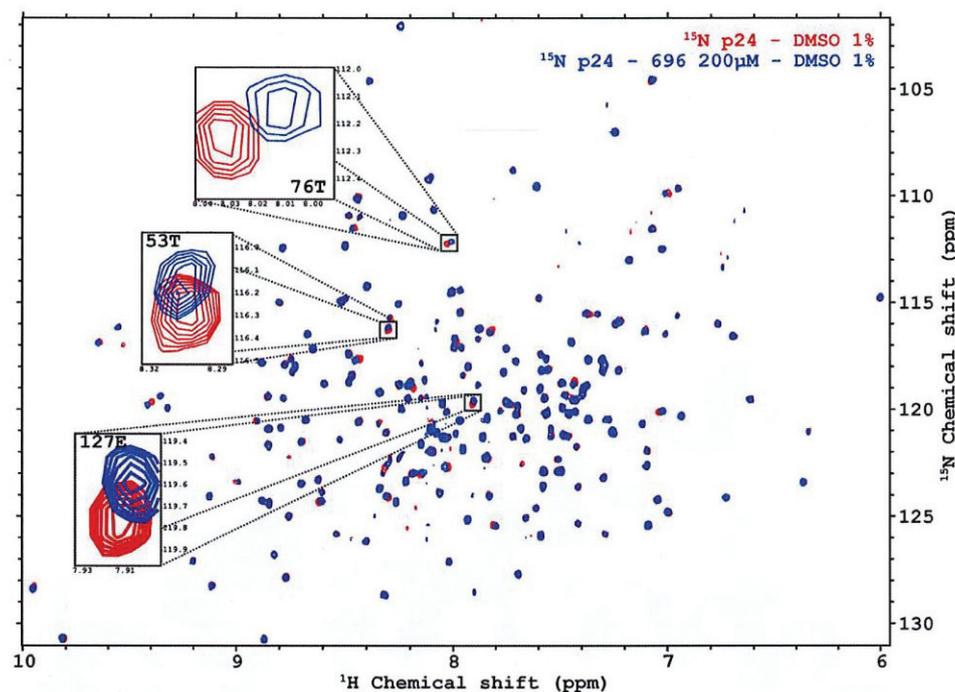
**D)**



**Figure 4.** NMR of FIV p24. (A) Summary of the p24 NMR signal assignments according to atom type. (B) Sequence of p24E $\Delta$ CP-T. Residues for which the NMR signals were assigned are highlighted in dark blue. (C) The p24 structure (PDB entry SNA2) is colored as follows: dark blue for assigned amino acids, gray for proline residues that do not have a proton amide, and light blue for unassigned residues. Secondary structures are also labeled according to PDB entry SNA2.<sup>56</sup> (D) <sup>13</sup>C secondary NMR chemical shifts ( $dC_{\alpha} - dC_{\beta}$ ) along the p24 sequence, with  $dC_{\alpha}$  and  $dC_{\beta}$  corresponding to differences between the experimental and random coil chemical shift values for <sup>13</sup>C $_{\alpha}$  and <sup>13</sup>C $_{\beta}$ , respectively. Positive and negative values indicate the presence of an  $\alpha$ -helix and a  $\beta$ -strand, respectively. Unassigned residues are displayed as gray boxes. Above the graph are plotted the secondary structures observed for the crystalline structure of FIV p24 (PDB entry SNA2<sup>56</sup>).

F

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 5.**  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectra of FIV p24. Overlay of 2D spectra of FIV p24 acquired in the absence (red) and presence (blue) of 696 (200  $\mu\text{M}$ ). The three resonances with the highest CSPs are enlarged.

This paper presents the first NMR assignment for the FIV p24 protein, which covers 83% of the total sequence (BRMB entry 50794). As observed in the NMR spectra, the quality of the signal is not uniform over the entire protein (Figure S1). The requirement for perdeuteration, as well as disparities in the quality of the NMR signal, remains puzzling, considering the size of the protein (24 kDa), as larger proteins have been assigned previously without perdeuteration.<sup>66,67</sup> Indeed, initially acquired NMR spectra of p24 without perdeuteration showed a poor signal:noise ratio (spectra not shown). In addition, even though the deuterium labeling improved the overall signal:noise ratio, some resonances were still too broad with a very low signal:noise ratio. These observations may be linked to potential low-affinity p24/p24 interactions in the NMR samples, although the protein concentration was maintained at 120  $\mu\text{M}$  to avoid multimerization.<sup>29</sup> HIV-1 p24 subunits of the hexamer were shown to interact with each other through their N-terminal  $\alpha 1$ – $\alpha 3$  helices and their C-terminal  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  helices (PDB entries 3H47 and 3MGE, respectively).<sup>26</sup> Moreover, we cannot exclude the possibility that certain p24 residues exhibit conformational dynamics on the microsecond to millisecond scale (intermediate exchange) that could result in line broadening. Although this assignment was incomplete, it was sufficient to identify the 696-binding site on FIV p24. As no known reference compound targeting FIV p24 has been described to date, our results represent a valuable tool for further studies of ligand-binding sites on FIV p24.

Interestingly, the relatively small number of NMR peaks that underwent CSPs upon 696 binding reveals the existence of a well-defined specific binding site on p24. On the basis of our NMR assignment, we were able to identify the p24 amino acid residues involved in binding. The combination of NMR spectroscopy and molecular docking allowed us to obtain a

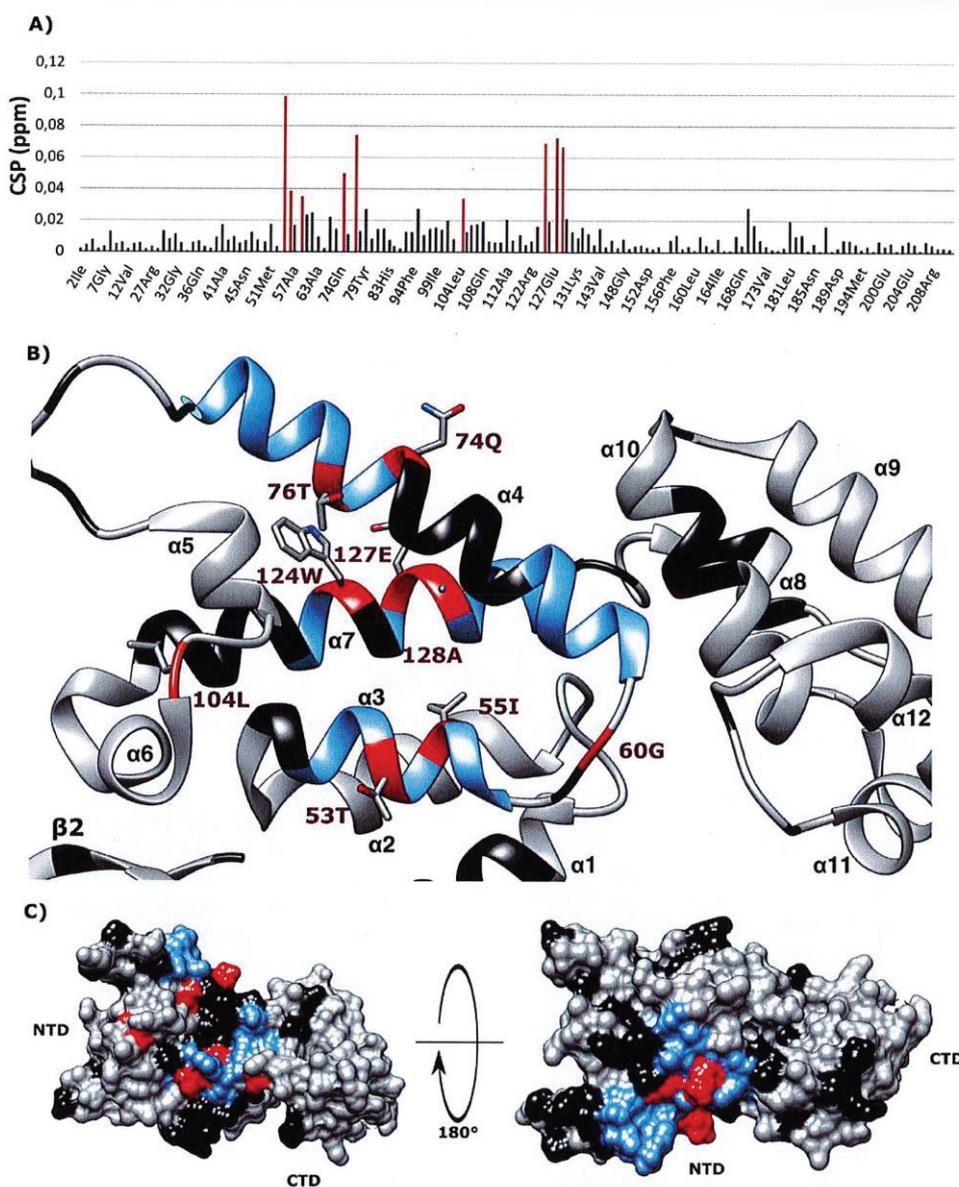
structural model of 696 bound to FIV p24. The results are consistent with a binding pocket delimited by helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 7$  on the protein. We also observed that two residues located outside of the pocket, Gly 60 and Leu 104, underwent CSPs upon inhibitor binding, suggesting a slight conformational readjustment of the loops linking these helices. Because of the ability of p24 to undergo rearrangement during viral assembly and maturation, it is possible that these conformational changes after 696 binding could lead to the decrease in the level of p24 assembly that we observed *in vitro*.

Compound 696 belongs to the benzimidazole family, one of the most common small molecule drug families listed by the U.S. Food and Drug Administration.<sup>68</sup> Some benzimidazoles have already been tested against HIV-1 p24. One (BM2) was shown to bind HIV-1 p24 but at a site delimited by helices  $\alpha 1$ – $\alpha 4$ .<sup>69</sup> These differences in binding sites can be explained by the low degree of sequence homology (29%) between the HIV-1 and FIV p24 proteins,<sup>56</sup> which can impact the interactions between the compounds and proteins, or by differences between the chemical groups present on the benzimidazole rings of BM2 and 696. Nonetheless, interactions between 696 and HIV-1 p24 are currently being tested.

Interestingly, the 696 capsid pocket is structurally conserved in HIV-1, where it is targeted by inhibitors such as PF74 or one of its derivatives, GS-6207, which is currently in clinical trials against HIV.<sup>41,49</sup> These compounds do not inhibit FIV replication *in vitro*,<sup>53</sup> but the molecular docking of 696 demonstrates that it interacts with FIV p24 in a manner similar to the interaction of PF74 with HIV-1 p24. It is interesting to note that these HIV-1 inhibitors have been demonstrated to target the p24:p24 interfaces in HIV-1 p24 capsomers.<sup>41,49,52</sup>

G

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 6.** Interaction between p24 and 696. (A) Combined  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  NMR CSPs induced in p24 upon binding of 696. The nine residues with the strongest CSPs ( $>3 \times \text{SD}$ ) are highlighted in red. (B) Localization of these nine amino acids (red) in the p24 structure (PDB entry 5NA2<sup>56</sup>). Helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 7$  are colored blue. Amino acids colored black are unassigned. (C) Mapping of these amino acids on the surface of p24 on opposite sides.

In HIV-1 p24, the conserved pocket also binds cellular partners such as human Nup153 (Figure 9A, PDB entry 4U0C) and CPSF6 (data not shown, PDB entry 4U0A<sup>70</sup>).

Interestingly, the peptide fragment of human CPSF6, which is implicated in the binding of HIV-1 p24 in the crystal structure, is 100% identical to its counterpart in the feline CPSF6 protein (*Felis catus* sequence, UniProtKB A0A2I2UG80, residues 313–327). Both feline Nup153 (fNup153, UniProtKB M3WFC8) and human Nup153 have a high degree of sequence identity of 89% for the region of hNup153 identified as interacting with HIV-1 p24. Therefore, we were able to model the binding of

feline Nup153 on FIV p24 from the structure of the human Nup153–HIV-1 p24 complex (Figure 9B).

We are currently investigating the molecular basis of the interactions between FIV p24 and feline Nup153 and CPSF6 to confirm this hypothesis. Regardless, these structural similarities between HIV-1 and FIV p24 and the sequence conservation between human and feline Nup153 and CPSF6 suggest a conserved mechanism of interaction among lentiviruses with cellular partners, as previously described for CypA.<sup>38</sup> We are currently seeking to determine the structure of the FIV p24 hexamer, which would confirm whether 696 indeed interacts with two adjacent monomers of capsomers. Such a finding

H

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX

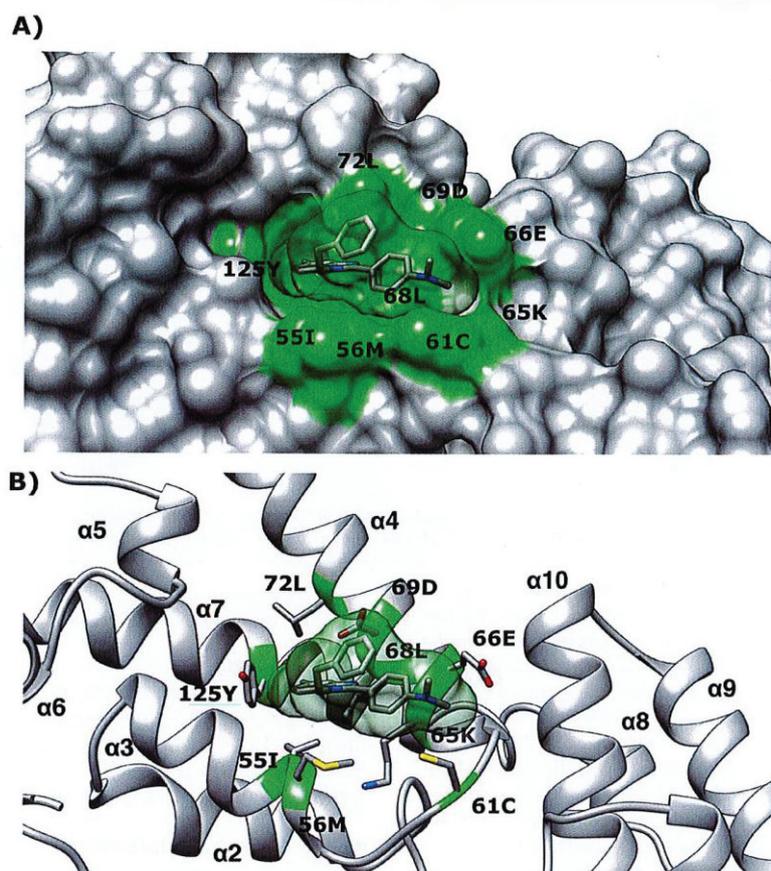


Figure 7. Molecular docking of compound 696 on the p24 surface using experimental NMR data. (A) Surface view and (B) ribbon view of the best docking solution for 696 (sticks and dark green surface) on p24. The residues identified to be involved in binding by LigPlot+ are colored light green.

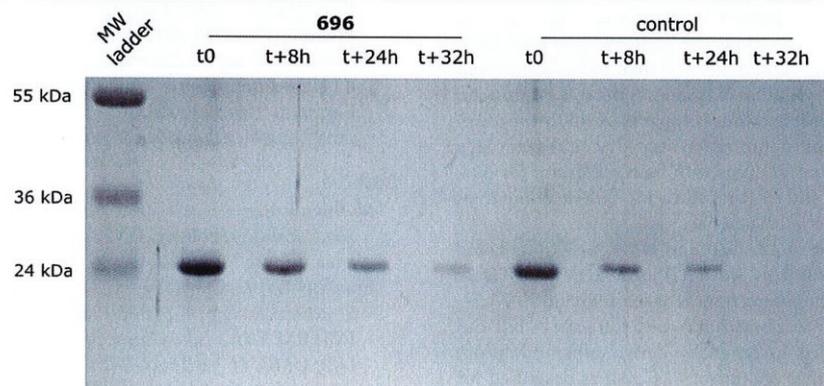


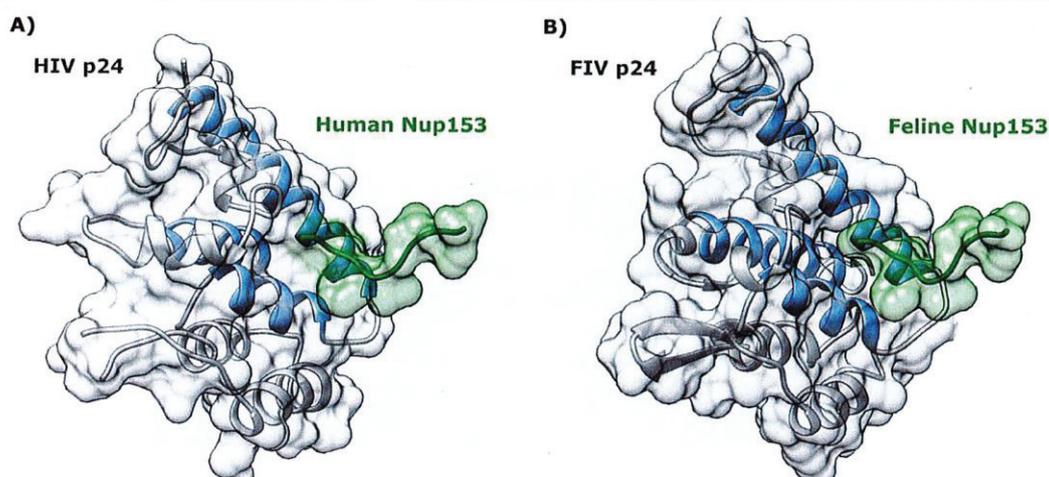
Figure 8. Effect of compound 696 on p24 disassembly analyzed by SDS-PAGE. The assembly of p24 was performed in the presence of either compound 696 or DMSO (control), and the kinetics of disassembly in a low-salinity buffer were then analyzed at several time points (immediately after and 8, 24, or 32 h after the initiation of disassembly) by SDS-PAGE.

would allow for structure-based improvements in compound 696 to target both sides of the p24:p24 interface in the hexamers. These observations are highly promising for the rational design of derivatives from 696 targeting FIV p24 that possess potent anti-FIV effects.

The affinity of 696 for monomeric p24 was estimated to be  $\sim 100 \mu\text{M}$  using MST, which is sufficient to consider 696 as a promising lead scaffold for further optimization. Moreover, if 696 behaves in a fashion similar to that of PF74 and its derivatives<sup>41,49,52</sup> and indeed interacts with two adjacent monomers of FIV p24, the  $K_d$  value we obtained using

I

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX-XXX



**Figure 9.** p24/Nup153 interactions. (A) Experimental structure of the human Nup153 peptide bound to HIV-1 p24 (PDB entry 4U0C). (B) Three-dimensional homology modeling of the feline Nup153 peptide on FIV p24. Helices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ , and  $\alpha_7$  are colored blue.

monomeric FIV p24 might be underestimated compared to what it would be using FIV p24 hexamers. Moreover, the low solubility of **696** in water and the requirement for DMSO for its resuspension limit the end-point concentrations we could use in MST or NMR experiments. Consequently, we cannot exclude the possibility that the saturating values observed by MST are biased and that the real  $K_d$  value is  $<100 \mu\text{M}$ . Solubility issues at high concentrations could also explain why the NMR CSP experiments did not reveal additional CSPs at  $400 \mu\text{M}$  (data not shown). Efforts to develop **696**-derived compounds that are more soluble in aqueous buffers will help clarify this point.

Indeed, as **696** is now identified as the first compound to target FIV capsid assembly, derivatives of this reference molecule will be developed on the basis of our NMR and molecular docking data and, when available, the structure of FIV p24 hexamers. These optimized compounds will first be characterized and selected using the strategy described here, and the more promising compounds will then be tested for their ability to inhibit FIV replication *in cellulo*. As the **696** compound is inexpensive to produce and thus compatible with the needs of veterinary medicine, this optimization strategy could eventually lead to the identification of drugs with better affinities for p24, low costs of synthesis, and antiviral efficacies, thus enabling their widespread use in veterinary practice.

Finally, it should be noted that the NMR assignment and molecular docking protocols we developed, and which were used to characterize the interaction between **696** and FIV p24, not only may be used to assess future **696** derivatives but can more generally be used to rationally design other inhibitory molecules targeting other regions of FIV p24, as described for HIV-1.<sup>71</sup> Taken together, our work represents the first steps toward the development of potent, low-cost inhibitors targeting the FIV p24 protein as a treatment for FIV infection.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.1c00228>.

Examples of NMR strips of HN(CO)CACB and HNCACB experiments used for sequential assignment (residues 206–213) (Figure S1), synthetic steps for the

preparation of **696** (Scheme S1), and detailed methods for the synthesis of **696** (PDF)

### Accession Codes

HIV-1 Gag, UniProtKB P04591; FIV Gag, UniProtKB P16087; subunit p24, BRMB 50794; human CypA, UniProtKB P62937; hNup153, UniProtKB P49790; hNup358, UniProtKB P49792; hCPSF6, UniProtKB Q16630; fCPSF6, UniProtKB A0A2I2UG80; fNup153, UniProtKB M3WFC8.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

Christophe Guillon – UMR 5086, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, CNRS/Université Lyon 1, 69367 Lyon, France; [orcid.org/0000-0001-6378-3303](https://orcid.org/0000-0001-6378-3303);

Phone: +33 437652904; Email: [christophe.guillon@ibcp.fr](mailto:christophe.guillon@ibcp.fr)

Guzmán I. Alvarez – Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, 60000 Paysandú, Uruguay; Phone: +598 47227950; Email: [guzmanalvarezlqo@gmail.com](mailto:guzmanalvarezlqo@gmail.com)

### Authors

Mathieu Long – UMR 5086, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, CNRS/Université Lyon 1, 69367 Lyon, France

François-Xavier Cantrelle – CNRS, ERL9002, Integrative Structural Biology, F-59000 Lille, France; Univ. Lille, INSERM, CHU Lille University Hospital, Institut Pasteur de Lille, UMR1167-RID-AGE-Risk factors and molecular determinants of aging-related, F-59000 Lille, France

Xavier Robert – UMR 5086, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, CNRS/Université Lyon 1, 69367 Lyon, France

Emmanuelle Boll – CNRS, ERL9002, Integrative Structural Biology, F-59000 Lille, France; Univ. Lille, INSERM, CHU Lille University Hospital, Institut Pasteur de Lille, UMR1167-RID-AGE-Risk factors and molecular determinants of aging-related, F-59000 Lille, France

Natalia Sierra – Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, 60000 Paysandú, Uruguay

Patrice Gouet – UMR 5086, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, CNRS/Université Lyon 1, 69367 Lyon, France

Xavier Hanouille – CNRS, ERL9002, Integrative Structural Biology, F-59000 Lille, France; Univ. Lille, INSERM, CHU Lille University Hospital, Institut Pasteur de Lille, UMR1167-RID-AGE-Risk factors and molecular determinants of aging-related, F-59000 Lille, France; [orcid.org/0000-0002-3755-2680](https://orcid.org/0000-0002-3755-2680)

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>

#### Author Contributions

C.G. and G.I.A. designed and coordinated the experiments. M.L. performed protein expression and purification. M.L. and C.G. performed MST experiments. N.S. performed compound synthesis and capsid assembly assays. F.-X.C., E.B., and X.H. acquired the NMR spectra. F.-X.C., E.B., X.H., and M.L. interpreted the NMR data and attributed the amino acids. X.R. performed the molecular docking. M.L., X.H., X.R., G.I.A., P.G., and C.G. analyzed the data. All authors contributed to the writing of the paper.

#### Funding

This work was supported by ECOS-Sud program U14S01 (Uruguay-France), the French Ministry of Research, and CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) program iniciación a la investigación 2017 Number ID275. Financial support from the IR-RMN-THC FR3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Dujardin and L. Lecoq for their NMR advice and R. Monserret and C. Fretton for their help with MST. Molecular graphics and analyses performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from National Institutes of Health Grant P41-GM103311.

#### REFERENCES

- Pedersen, N. C., Ho, E. W., Brown, M. L., and Yamamoto, J. K. (1987) Isolation of a T-Lymphotropic Virus from Domestic Cats with an Immunodeficiency-like Syndrome. *Science* 235, 790–793.
- Brown, M. A., Munkhtsog, B., Troyer, J. L., Ross, S., Sellers, R., Fine, A. E., Swanson, W. F., Roelke, M. E., and O'Brien, S. J. (2010) Feline Immunodeficiency Virus (FIV) in Wild Pallas' Cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 90–95.
- O'Brien, S. J., Troyer, J. L., Brown, M. A., Johnson, W. E., Antunes, A., Roelke, M. E., and Pecon-Slattery, J. (2012) Emerging Viruses in the Felidae: Shifting Paradigms. *Viruses* 4, 236–257.
- Roelke, M. E., Brown, M. A., Troyer, J. L., Winterbach, H., Winterbach, C., Hemson, G., Smith, D., Johnson, R. C., Pecon-Slattery, J., Roca, A. L., Alexander, K. A., Klein, L., Martelli, P., Krishnasamy, K., and O'Brien, S. J. (2009) Pathological Manifestations of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in Wild African Lions. *Virology* 390, 1–12.
- Mohammadi, H., and Bienzle, D. (2012) Pharmacological Inhibition of Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Viruses* 4, 708–724.
- Mora, M., Napolitano, C., Ortega, R., Poulin, E., and Pizarro-Lucero, J. (2015) Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infection in Free-Ranging Guignas (Leopardus Guigna) and Sympatric Domestic Cats in Human Perturbed Landscapes on Chiloé Island, Chile. *J. Wildl. Dis.* 51, 199–208.
- Sahay, B., and Yamamoto, J. K. (2018) Lessons Learned in Developing a Commercial FIV Vaccine: The Immunity Required for an Effective HIV-1 Vaccine. *Viruses* 10, 277.
- Hosie, M. J., Techakriengkrai, N., Bęczkowski, P. M., Harris, M., Logan, N., and Willett, B. J. (2017) The Comparative Value of Feline Virology Research: Can Findings from the Feline Lentiviral Vaccine Be Translated to Humans? *Vet. Sci.* 4, 7.
- Miller, C., Emanuelli, M., Fink, E., Musselman, E., Mackie, R., Troyer, R., Elder, J., and VandeWoude, S. (2018) FIV Vaccine with Receptor Epitopes Results in Neutralizing Antibodies but Does Not Confer Resistance to Challenge. *npj Vaccines* 3, 16.
- Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E., Johnson, W., VandeWoude, S., Vazquez-Salat, N., Brown, M., Frank, L., Woodroffe, R., Winterbach, C., Winterbach, H., Hemson, G., Bush, M., Alexander, K. A., Revilla, E., and O'Brien, S. J. (2005) Seroprevalence and Genomic Divergence of Circulating Strains of Feline Immunodeficiency Virus among Felidae and Hyacinthidae Species. *J. Virol.* 79, 8282–8294.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Malvaldi, G., and Tozzini, F. (1995) Feline Immunodeficiency Virus: An Interesting Model for AIDS Studies and an Important Cat Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 87–112.
- Elder, J. H., Lin, Y.-C., Fink, E., and Grant, C. K. (2010) Feline Immunodeficiency Virus (FIV) as a Model for Study of Lentivirus Infections: Parallels with HIV. *Curr. HIV Res.* 8, 73–80.
- Meeker, R. B., and Hudson, L. (2017) Feline Immunodeficiency Virus Neurodegeneration: A Model for HIV-Induced CNS Inflammation and Neurodegeneration. *Vet. Sci.* 4, 14.
- Yamamoto, J. K., Sanou, M. P., Abbott, J. R., and Coleman, J. K. (2010) Feline Immunodeficiency Virus Model for Designing HIV/AIDS Vaccines. *Curr. HIV Res.* 8, 14–25.
- Schwartz, A. M., McCrackin, M. A., Schinazi, R. F., Hill, P. B., Vahlenkamp, T. W., Tompkins, M. B., and Hartmann, K. (2014) Antiviral Efficacy of Nine Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors against Feline Immunodeficiency Virus in Feline Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Am. J. Vet. Res.* 75, 273–281.
- Smyth, N. R., McCracken, C., Gaskell, R. M., Cameron, J. M., Coates, J. A., Gaskell, C. J., Hart, C. A., and Bennett, M. (1994) Susceptibility in Cell Culture of Feline Immunodeficiency Virus to Eighteen Antiviral Agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 34, 589–594.
- Hartmann, K., Wooding, A., and Bergmann, M. (2015) Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus. *Vet. Sci.* 2, 456–476.
- Abdusetir Cerfoglio, J. C., González, S. A., and Affranchino, J. L. (2014) Structural Elements in the Gag Polyprotein of Feline Immunodeficiency Virus Involved in Gag Self-Association and Assembly. *J. Gen. Virol.* 95, 2050–2059.
- Affranchino, J. L., and González, S. A. (2010) In Vitro Assembly of the Feline Immunodeficiency Virus Gag Polyprotein. *Virus Res.* 150, 153–157.
- González, S. A., and Affranchino, J. L. (2018) Properties and Functions of Feline Immunodeficiency Virus Gag Domains in Virion Assembly and Budding. *Viruses* 10, 261.
- Nath, M. D., and Peterson, D. L. (2001) In Vitro Assembly of Feline Immunodeficiency Virus Capsid Protein: Biological Role of Conserved Cysteines. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 287–294.
- Ovejero, C. A., González, S. A., and Affranchino, J. L. (2019) The Conserved Tyr176/Leu177 Motif in the  $\alpha$ -Helix 9 of the Feline Immunodeficiency Virus Capsid Protein Is Critical for Gag Particle Assembly. *Viruses* 11, 816.
- Kutluay, S. B., and Bieniasz, P. D. (2010) Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. *PLoS Pathog.* 6, No. e1001200.
- Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T., and Sundquist, W. I. (1999) Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science* 283, 80–83.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., and Yeager, M. (2011) Atomic-Level Modelling of the HIV Capsid. *Nature* 469, 424–427.

K

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00228>  
Biochemistry XXXX, XXX, XXX–XXX

- (26) Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Kelly, B. N., Hua, Y., Whitby, F. G., Stout, C. D., Sundquist, W. I., Hill, C. P., and Yeager, M. (2009) X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell* 137, 1282–1292.
- (27) Tomasini, M. D., Johnson, D. S., Mincer, J. S., and Simon, S. M. (2018) Modeling the Dynamics and Kinetics of HIV-1 Gag during Viral Assembly. *PLoS One* 13, No. e0196133.
- (28) Sundquist, W. I., and Kräusslich, H.-G. (2012) HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2, No. a006924.
- (29) Serrière, J., Fenel, D., Schoehn, G., Gouet, P., and Guillon, C. (2013) Biophysical Characterization of the Feline Immunodeficiency Virus P24 Capsid Protein Conformation and In Vitro Capsid Assembly. *PLoS One* 8, No. e56424.
- (30) Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., and Campbell, E. M. (2020) Nuclear Pore Blockade Reveals That HIV-1 Completes Reverse Transcription and Uncoating in the Nucleus. *Nat. Microbiol.* 5, 1088–1095.
- (31) Dismuke, D. J., and Aiken, C. (2006) Evidence for a Functional Link between Uncoating of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core and Nuclear Import of the Viral Preintegration Complex. *J. Virol.* 80, 3712–3720.
- (32) Jacques, D. A., McEwan, W. A., Hilditch, L., Price, A. J., Towers, G. J., and James, L. C. (2016) HIV-1 Uses Dynamic Capsid Pores to Import Nucleotides and Fuel Encapsidated DNA Synthesis. *Nature* 536, 349–353.
- (33) Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S. A., and Fassati, A. (2011) Transportin 3 Promotes a Nuclear Maturation Step Required for Efficient HIV-1 Integration. *PLoS Pathog.* 7, No. e1002194.
- (34) Selyutina, A., Persaud, M., Lee, K., KewalRamani, V., and Diaz-Griffero, F. (2020) Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating. *Cell Rep.* 32, 108201.
- (35) Dharan, A., and Campbell, E. M. (2018) Role of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins in HIV-1 Infection. *J. Virol.* 92, No. e00085-18.
- (36) Fernandez, J., Portillo, D. M., Danckaert, A., Munier, S., Becker, A., Roux, P., Zambo, A., Shorte, S., Jacob, Y., Vidalain, P.-O., Charneau, P., Clavel, F., and Arhel, N. J. (2015) Microtubule-Associated Proteins 1 (MAP1) Promote Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Intracytoplasmic Routing to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 290, 4631–4646.
- (37) Pawlica, P., and Berthou, L. (2014) Cytoplasmic Dynein Promotes HIV-1 Uncoating. *Viruses* 6, 4195–4211.
- (38) Goldstone, D. C., Yap, M. W., Robertson, L. E., Haire, L. F., Taylor, W. R., Katzourakis, A., Stoye, J. P., and Taylor, I. A. (2010) Structural and Functional Analysis of Prehistoric Lentiviruses Uncovers an Ancient Molecular Interface. *Cell Host Microbe* 8, 248–259.
- (39) Arhel, N. (2010) Revisiting HIV-1 Uncoating. *Retrovirology* 7, 96.
- (40) Burdick, R. C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J. M. O., Nagashima, K., Hu, W.-S., and Pathak, V. K. (2020) HIV-1 Uncoats in the Nucleus near Sites of Integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 5486–5493.
- (41) Bhattacharya, A., Alam, S. L., Fricke, T., Zadrozny, K., Sedzicki, J., Taylor, A. B., Demeler, B., Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Diaz-Griffero, F., Ivanov, D. N., and Yeager, M. (2014) Structural Basis of HIV-1 Capsid Recognition by PF74 and CPSF6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 18625–18630.
- (42) Xie, L., Chen, L., Zhong, C., Yu, T., Ju, Z., Wang, M., Xiong, H., Zeng, Y., Wang, J., Hu, H., Hou, W., and Feng, Y. (2020) MxB Impedes the NUP358-Mediated HIV-1 Pre-Integration Complex Nuclear Import and Viral Replication Cooperatively with CPSF6. *Retrovirology* 17, 16.
- (43) Matreyek, K. A., Yücel, S. S., Li, X., and Engelman, A. (2013) Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity. *PLoS Pathog.* 9, No. e1003693.
- (44) Price, A. J., Fletcher, A. J., Schaller, T., Elliott, T., Lee, K., KewalRamani, V. N., Chin, J. W., Towers, G. J., and James, L. C. (2012) CPSF6 Defines a Conserved Capsid Interface That Modulates HIV-1 Replication. *PLoS Pathog.* 8, No. e1002896.
- (45) Tang, C., Loeliger, E., Kinde, I., Kyere, S., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M., and Summers, M. F. (2003) Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein. *J. Mol. Biol.* 327, 1013–1020.
- (46) Kortagere, S., Madani, N., Mankowski, M. K., Schön, A., Zentner, L., Swaminathan, G., Princiotta, A., Anthony, K., Oza, A., Sierra, L.-J., Passic, S. R., Wang, X., Jones, D. M., Stavale, E., Krebs, F. C., Martín-García, J., Freire, E., Ptak, R. G., Sodroski, J., Cocklin, S., and Smith, A. B. (2012) Inhibiting Early-Stage Events in HIV-1 Replication by Small-Molecule Targeting of the HIV-1 Capsid. *J. Virol.* 86, 8472–8481.
- (47) Zhang, H., Zhao, Q., Bhattacharya, S., Waheed, A. A., Tong, X., Hong, A., Heck, S., Curreli, F., Goger, M., Cowburn, D., Freed, E. O., and Debnath, A. K. (2008) A Cell-Penetrating Helical Peptide as a Potential HIV-1 Inhibitor. *J. Mol. Biol.* 378, 565–580.
- (48) Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Müller, B., Dietrich, U., Werner, J., and Kräusslich, H.-G. (2005) A Peptide Inhibitor of HIV-1 Assembly In Vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 671–677.
- (49) Link, J. O., Rhee, M. S., Tse, W. C., Zheng, J., Somoza, J. R., Rowe, W., Begley, R., Chiu, A., Mulato, A., Hansen, D., Singer, E., Tsai, L. K., Bam, R. A., Chou, C.-H., Canales, E., Brizgys, G., Zhang, J. R., Li, J., Graupe, M., Morganelli, P., Liu, Q., Wu, Q., Halcomb, R. L., Saito, R. D., Schroeder, S. D., Lazerwith, S. E., Bondy, S., Jin, D., Hung, M., Novikov, N., Liu, X., Villaseñor, A. G., Cannizzaro, C. E., Hu, E. Y., Anderson, R. L., Appleby, T. C., Lu, B., Mwangi, J., Licican, A., Niedziela-Majka, A., Papalia, G. A., Wong, M. H., Leavitt, S. A., Xu, Y., Koditek, D., Stepan, G. J., Yu, H., Pagratis, N., Clancy, S., Ahmadyar, S., Cai, T. Z., Sellers, S., Wolckenhauer, S. A., Ling, J., Callebaut, C., Margot, N., Ram, R. R., Liu, Y.-P., Hyland, R., Sinclair, G. I., Ruane, P. J., Crofoot, G. E., McDonald, C. K., Brainard, D. M., Lad, L., Swaminathan, S., Sundquist, W. I., Sakowicz, R., Chester, A. E., Lee, W. E., Daar, E. S., Yant, S. R., and Cihlar, T. (2020) Clinical Targeting of HIV Capsid Protein with a Long-Acting Small Molecule. *Nature* 584, 614–618.
- (50) Rihn, S. J., Wilson, S. J., Loman, N. J., Alim, M., Bakker, S. E., Bhella, D., Gifford, R. J., Rixon, F. J., and Bieniasz, P. D. (2013) Extreme Genetic Fragility of the HIV-1 Capsid. *PLoS Pathog.* 9, No. e1003461.
- (51) Balasubramaniam, M., Zhou, J., Addai, A., Martinez, P., Pandhare, J., Aiken, C., and Dash, C. (2019) PF74 Inhibits HIV-1 Integration by Altering the Composition of the Preintegration Complex. *J. Virol.* 93, No. e01741-18.
- (52) McArthur, C., Gallazzi, F., Quinn, T. P., and Singh, K. (2019) HIV Capsid Inhibitors Beyond PF74. *Diseases* 7, 56.
- (53) Fricke, T., Buffone, C., Opp, S., Valle-Casuso, J., and Diaz-Griffero, F. (2014) BI-2 Destabilizes HIV-1 Cores during Infection and Prevents Binding of CPSF6 to the HIV-1 Capsid. *Retrovirology* 11, 120.
- (54) Sierra, N., Folio, C., Robert, X., Long, M., Guillon, C., and Alvarez, G. (2018) Looking for Novel Capsid Protein Multimerization Inhibitors of Feline Immunodeficiency Virus. *Pharmaceuticals* 11, 67.
- (55) Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazić, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D., and Duhr, S. (2013) Microscale Thermophoresis Quantifies Biomolecular Interactions under Previously Challenging Conditions. *Methods* 59, 301–315.
- (56) Folio, C., Sierra, N., Dujardin, M., Alvarez, G., and Guillon, C. (2017) Crystal Structure of the Full-Length Feline Immunodeficiency Virus Capsid Protein Shows an N-Terminal  $\beta$ -Hairpin in the Absence of N-Terminal Proline. *Viruses* 9, 335.
- (57) Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX Pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293.
- (58) Mayzel, M., Rosenlöw, J., Isaksson, L., and Orekhov, V. Y. (2014) Time-Resolved Multidimensional NMR with Non-Uniform Sampling. *J. Biomol. NMR* 58, 129–139.
- (59) Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D.

- (2005) The CCPN Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 59, 687–696.
- (60) Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- (61) Sanner, M. F., Olson, A. J., and Spehner, J. C. (1996) Reduced Surface: An Efficient Way to Compute Molecular Surfaces. *Biopolymers* 38, 305–320.
- (62) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791.
- (63) Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
- (64) Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011) LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2778–2786.
- (65) Bocanegra, R., Nevot, M., Doménech, R., López, I., Abián, O., Rodríguez-Huete, A., Cavasotto, C. N., Velázquez-Campoy, A., Gómez, J., Martínez, M. A., Neira, J. L., and Mateu, M. G. (2011) Rationally Designed Interfacial Peptides Are Efficient In Vitro Inhibitors of HIV-1 Capsid Assembly with Antiviral Activity. *PLoS One* 6, No. e23877.
- (66) Kay, L. E., and Gardner, K. H. (1997) Solution NMR Spectroscopy beyond 25 KDa. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 722–731.
- (67) Frueh, D. P., Goodrich, A. C., Mishra, S. H., and Nichols, S. R. (2013) NMR Methods for Structural Studies of Large Monomeric and Multimeric Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 734–739.
- (68) Taylor, R. D., MacCoss, M., and Lawson, A. D. G. (2014) Rings in Drugs. *J. Med. Chem.* 57, 5845–5859.
- (69) Lemke, C. T., Titolo, S., von Schwedler, U., Goudreau, N., Mercier, J.-F., Wardrop, E., Faucher, A.-M., Coulombe, R., Banik, S. S. R., Fader, L., Gagnon, A., Kawai, S. H., Rancourt, J., Tremblay, M., Yoakim, C., Simoneau, B., Archambault, J., Sundquist, W. I., and Mason, S. W. (2012) Distinct Effects of Two HIV-1 Capsid Assembly Inhibitor Families That Bind the Same Site within the N-Terminal Domain of the Viral CA Protein. *J. Virol.* 86, 6643–6655.
- (70) Price, A. J., Jacques, D. A., McEwan, W. A., Fletcher, A. J., Essig, S., Chin, J. W., Halambage, U. D., Aiken, C., and James, L. C. (2014) Host Cofactors and Pharmacologic Ligands Share an Essential Interface in HIV-1 Capsid That Is Lost upon Disassembly. *PLoS Pathog.* 10, No. e1004459.
- (71) Carnes, S. K., Sheehan, J. H., and Aiken, C. (2018) Inhibitors of the HIV-1 Capsid, A Target of Opportunity. *Curr. Opin. HIV AIDS* 13, 359–365.



---

## **Étude structurale de la protéine de capsid du virus de l'immunodéficience féline à des fins thérapeutiques**

Le virus de l'immunodéficience féline (FIV) est un lentivirus, comme le VIH-1 qui infecte l'Homme. Le FIV infecte les félins domestiques et sauvages et représente un enjeu vétérinaire majeur car il cause un syndrome de type SIDA chez les animaux infectés. Aucun traitement efficace contre le FIV n'a été identifié à ce jour. La capsid du virus est une cible thérapeutique d'intérêt et une molécule ciblant la capsid du VIH-1 est en cours d'essai clinique. L'objectif de cette thèse est d'identifier des molécules interférant avec la capsid du FIV, par criblage et par identification rationnelle à l'aide de données structurales. La capsid est un assemblage d'oligomères de protéine de capsid p24. Un des aspects de ce travail est l'obtention d'hexamères stables de p24 FIV pour la résolution de la structure de cet assemblage. Par ailleurs, une autre approche par criblage a permis d'identifier une molécule interférant avec l'assemblage de la capsid. La première attribution de p24 FIV par résonance magnétique nucléaire a permis la caractérisation du site de fixation de ce composé, qui est homologue à celui identifié pour la molécule en cours d'essai clinique ciblant la capsid du VIH-1. Ce composé anti VIH-1 entrant en compétition avec des partenaires cellulaires indispensables à la réplication du VIH-1, nos résultats suggèrent que le composé identifié contre p24 FIV aurait une action similaire. Ainsi, ce composé est prometteur pour la mise au point de traitements efficaces contre le FIV.

## **Structural study of Feline Immunodeficiency Virus capsid protein for therapeutic purposes**

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a lentivirus, as HIV-1 infecting human beings. FIV infects both domestic and wild feline species and is a veterinary threat as it induces an AIDS-like syndrome in infected animals. To this day, no efficient treatment against FIV has been identified. The viral capsid is a therapeutic target of interest, and one drug binding the HIV-1 capsid is currently in clinical trials. The objective of this thesis is to identify molecules interfering with the FIV capsid through screening of existing compounds or rational drug design using structural data. The capsid is an assembly of oligomers of p24 capsid protein subunits. One of the aims of this work was the obtention of stable hexamers of FIV p24 to solve the structure of these oligomers. In the meantime, a screening identified one compound interfering with capsid assembly. The first attribution of FIV p24 through nuclear magnetic resonance allowed identifying the binding site of this molecule on FIV p24. This site is homologous to the binding site of the capsid-targeting drug in clinical trials. As that anti-HIV-1 compound competes with the bonding of cellular proteins necessary for HIV-1 replication, our results suggest our compound targeting FIV p24 could target a similar mechanism. Therefore, this compound is a promising drug for the development of efficient anti FIV drugs.

---