



Interaction de Gag(NC) du VIH-1 avec la protéine ribosomique RPL7 : caractérisation du complexe et rôle dans le cycle réplcatif

Hassan Karnib

► To cite this version:

Hassan Karnib. Interaction de Gag(NC) du VIH-1 avec la protéine ribosomique RPL7 : caractérisation du complexe et rôle dans le cycle réplcatif. Sciences pharmaceutiques. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ013 . tel-03699092

HAL Id: tel-03699092

<https://theses.hal.science/tel-03699092>

Submitted on 20 Jun 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire de biophotonique et pharmacologie, UMR 7213,

Faculté de Pharmacie, Illkirch

THÈSE

Présentée par :

Hassan KARNIB

Soutenue le : 7 Avril 2017

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

Discipline/ Spécialité : Biophysique et Biologie structurale

**Interaction de Gag(NC) du VIH-1 avec la protéine
ribosomique RPL7: caractérisation du complexe
et rôle dans le cycle réplcatif**

THÈSE dirigée par :

Dr. Hugues de ROCQUIGNY

Chargé de recherches, Université de Strasbourg

EXAMINATEUR :

Dr. Marc RUFF

Directeur de recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Philippe FOSSÉ

Directeur de recherches, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay

Dr. Serge BOUAZIZ

Directeur de recherches, Université Paris Descartes

MEMBRES INVITES :

Pr. Yves MÉLY

Directeur de l'UMR 7213, Université de Strasbourg

Dr. Christian BOUDIER

Chargé de recherches, Université de Strasbourg

Remerciement,

Le hasard est le maître du monde

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de trois ans quand j'ai décidé de pousser la porte du laboratoire d'Hugues, débarqué un peu par hasard avec une confiance en soi et espoir de se trouver dans ce travail.

Au début, je veux adresser tous mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé pour finir cette thèse et rédigé ce mémoire.

En commençant par remercier tout d'abord Dr. Hugues de Rocquigny, directeur de recherche de ce mémoire, pour son aide précieux, pour le temps qu'il m'a consacré et pour la confiance qui m'a attribué, je n'aurais pas pu imaginer un environnement plus favorable pour effectuer ma thèse.

Merci à Pr. Yves Mély, directeur de l'UMR 7213 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ces remarques précieuses qui m'ont aidé à développer mes compétences.

Merci à Dr. Kamal Kant Sharma, qui m'a transmis ces connaissances sur toutes les techniques du laboratoire et m'a guidé vers la bonne route.

Merci à Dr. Christian Boudier, qui m'a accordé beaucoup de son temps pour discuter autour du sujet de thèse et d'autres sujets divers.

Je tenais également à remercier tous les membres de l'équipe 1 du laboratoire de biophotonique et pharmacologie, surtout Dr. Emmanuel Boutant, Dr. Eléonore réal et les doctorants et stagiaires qui transfèrent toujours l'énergie positive, Merci à vous : Liliana ZAITER, Wassim ACHRAF, Manuel PIRES, Tanveer AHMAD, Lesia KOVALENKO, Rajhans SHARMA, Muhammad Faisal NADEEM et tous les autres membres de notre équipe.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : mes parents, mes sœurs et tous mes proches et amis, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

لحظة إنتهاء العاصفة ، لن تتذكر كيف نجوت منها ،

لن تتذكر كيف تدبرت أمرك لتنجو ،

ولن تدرك هل انتهت العاصفة أم لا .

ستكون متيقناً من أمر واحد فقط :

حين تخرج من العاصفة لن تعود الشخص نفسه الذي دخل

Table des matières

Introduction.....	1
I.1- Virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1)	2
I.1.1 Classification.....	2
I.1.2 Historique	3
I.1.3 Phylogénie et diversité génétique du VIH	3
I.1.4 Mode de transmission.....	4
I.1.5 Infection par le VIH.....	5
I.2 La structure du VIH-1.....	7
I.2.1 structure de la particule virale	7
I.2.2 Le génome viral	8
I.2.2.1 L'ARN viral	8
Les régions non codantes.....	8
I.2.2.2 L'ADN proviral	11
Les régions non-codantes.....	11
Les régions codantes	12
I.2.3 Les protéines Virales	12
I.2.3.1 Les protéines d'enveloppe	12
I.2.3.2 Les polyprotéines de structure Gag et Gag-Pol.....	13
I.2.3.2.1 La matrice (MA, p17)	14
I.2.3.2.2 La Capside (CA, p24).....	15
I.2.3.2.3 La nucléocapside (NCp7)	16
I.2.3.2.4 Le peptide p6.....	19
I.2.3.2.5 Les peptides SP1 et SP2.....	20
I.2.3.3 Les protéines enzymatiques.....	20
I.2.3.3.1 La protéase (PR)	20
I.2.3.3.2 L'intégrase (IN)	20
I.2.3.3.3 La reverse transcriptase (RT).....	21
I.2.3.4 Les protéines régulatrices et auxiliaires	22
I.2.3.4.1 Tat (<i>Transactivator of transcription</i>)	22
I.2.3.4.2 Rev (<i>Regulatory of virion expression</i>).....	22
I.2.3.4.3 Vpr (<i>Viral Protein R</i>).....	22
I.2.3.4.4 Nef (<i>Negative regulatory factor</i>)	23

I.2.3.4.5 Vif (<i>Virion infectivity factor</i>)	23
I.2.3.4.6 Vpu (<i>Viral protein u</i>)	23
II. Le cycle réplcatif du VIH-1	24
II.1 La phase précoce de la réplication du VIH-1	25
II.1.1 Reconnaissance, fusion et entrée	25
II.1.2 Décapsidation et rétro transcription	26
II.1.3 Transport nucléaire et intégration de l'ADN proviral.....	29
II.2 Les phases tardives de la réplication du VIH-1.....	30
II.2.1 Transcription de l'ADN proviral et épissage du transcrit primaire.....	30
II.2.2 Export nucléaire des ARNm.....	31
II.2.3 Traduction des ARNm.....	31
II.2.4 Assemblage et relargage des virions	32
II.2.5 Maturation de la particule virale.....	33
III. Les partenaires cellulaires de la polyprotéine Gag du VIH-1	33
IV. Les protéines ribosomales	36
IV.1 La RPL7 humaine (Ribosomal Protein L7)	39
IV.1.1 Structure.....	39
IV.1.2 Localisation cellulaire	41
IV.1.3 Fonctions	42
V. Activité chaperonne :	43
V.1. Activité chaperonne des protéines :	44
V.2. Activité chaperonne des acides nucléiques (AN):.....	44
V.2.1 Principe de l'activité chaperonne des AN	44
V.2.2 tests de l'activité chaperonne	46
V.2.3 Exemples de protéines chaperonnes des acides nucléiques : la NCp7, Gag du VIH-1 et les protéines ribosomales.....	51
Objectif du travail de thèse	59
Article 1	61
Article 2	85
Article 3	117
Conclusions et perspectives	146
Références.....	150

Table des figures :

Figure 1 : Taxonomie du VIH .	2
Figure 2 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1	6
Figure 3: VIH en cour de bourgeonnement.....	7
Figure 4 : Structure secondaire de la région 5' du VIH.....	10
Figure 5 : Représentation schématique de l'ADN proviral du VIH-1.....	11
Figure 6 : Schéma montrant la structure et fonction de la polyprotéine Gag	14
Figure 7 : Assemblage et structure du virus VIH-1 immature	15
Figure 8 : Clivage de la protéine Gag par la protéase virale chez VIH-1	16
Figure 9 : Schéma représentant la séquence de la NCp7	17
Figure 10 : Structure RMN de la NCp7	18
Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine NCp7 du VIH-1 et l'UTR du génome virale.....	19
Figure 12 : schéma montrant l'organisation du complexe intégrase/LEDGF.....	21
Figure 13 : cycle de réplication du VIH-1.....	25
Figure 14 : représentation schématique des étapes d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible	26
Figure 15 : schéma des principales étapes de la transcription inverse chez le VIH-1.....	27
Figure 16 : La structure du ribosome humain 80S seul.....	36
Figure 17 : Schéma montrant les rôles des protéines ribosomales	39
Figure 18 : structure tridimensionnelle de la protéine RPL7	40
Figure 19 : gel retard entre 10nM de la séquence RRE, TAR et ARN simple brin .	41
Figure 20 : Analyse de la localisation cellulaire de Flag-RPL7	42
Figure 21 : courbes montrant l'effet dose de l'inhibition médiée par la RPL7 dans un système de traduction acellulaire	43
Figure 22: Modèle de transfert d'énergie	46
Figure 23 : Schéma montrant le principe du test d'hybridation de cTAR-dTAR	48
Figure 24: Schéma montrant les différents tests <i>in vitro</i> utilisés pour investir l'activité chaperonne des acides nucléiques d'une protéine cible	49
Figure 25: Schéma montrant les différents tests <i>in cellulo</i> utilisés pour investir l'activité chaperonne des acides nucléiques d'une protéine cible.	51
Figure 26: schéma montrant la déstabilisation de cTAR par la NCp7.	52
Figure 27: Schéma montrant le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la NCp7....	53

Liste des abréviations

ABCE	: Cellular ATP-binding protein
ADN	: Adénosine désoxyribonucléotide
ADNss	: ADN strong stop
ALIX	: Apoptosis linked gene 2 interacting protein X
AN	: Acide nucléique
APOBEC	: Apo-lipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide
Arg	: Arginine
ARN	: Adénosine ribonucleotide
Asp	: Asparagine
BMH	: Branched multiple hairpin
CA	: Capside
CD4	: Cluster de différenciation 4
CDK9	: Kinase 9 cycline dépendante
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	: Cellule présentatrice d'antigène
CTD	: C-terminal domain
Cys	: Cystéine
DIS	: Dimerization initiation site
E.coli	: Escherichia Coli
Env	: Enveloppe
ESCRT	: Endosomal sorting complex required for transport
FCS	: Fluorescence correlation spectroscopy
FRET	: Fluorescence resonance energy transfert
Gag	: Groupe spécifique d'antigène
Gly	: Glycine
GP	: Glycoprotein

HBR : Highly basic region

HBV : Hepatitis B virus

HCV : Hepatitis C virus

His : Histidine

HIV : Human immunodeficiency virus

HSP : Heat shock protein

IN : Intégrase

INBI : Integrase binding inhibitors

INSTP: Integrase transfer inhibitors

IRES : Internal ribosome entry site

LTR : Long terminal repeat

Lytic : Lysine rich carcino-embryonic antigen related cell adhesion molecule coisolated

Lys : Lysine

MA : Matrice

NES : Nuclear export signal

Nef : Negative regulatory factor

NLS : Nuclear localization signal

Nuc : Nucléoline

OMS : Organisation mondiale de santé

PBS : Primer binding site

PPT : Polypurine tract

PPTc: Polypurine tract central

PR : Protéase

Phe : Phenylalanine

RE : Reticulum endoplasmique

Rev : Regulatory of virion expression

RRE : Rev responsive element

RT : Reverse transcriptase

RTion : Reverse transcription

SD : Site donneur d'épissage

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SMS : Single molecule spectroscopy

SPR : Surface plasmon resonance

Stau : Staufen

TAR : Trans activating response element

Tat : Transactivator of transcription

TBP : TATA binding protein

UTR : Untranslated region

Zn : Zinc

Introduction

I.1- Virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1)

I.1.1 Classification

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), est responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise ou SIDA (1). Ce virus est du genre des lentivirus qui fait partie de la famille des *Retroviridae* (rétrovirus). Les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant deux ARN monocaténares de polarité positive. Le nom de rétrovirus viens de l'enzyme virale, la reverse transcriptase, qui permet la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN double brin (2). Le genre 'lentivirus' signifie que le virus présente une longue période de latence dans l'organisme avant de manifester son pouvoir pathogène (3). Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par leur capacité à infecter des cellules quiescentes comme les macrophages et les monocytes (4). Les lentivirus sont classés en cinq espèces suite à la dernière classification du Comité international de taxonomie des virus (ICTV) en 2013: VIB (Virus de l'immunodéficience Bovine), VIF (Virus de l'immunodéficience Féline), AIE (Anémie infectieuse des équidés), VIS (virus de l'immunodéficience simienne) et le VIH très diversifié qui sera lui-même classé en deux sous-types VIH-1 et VIH-2.

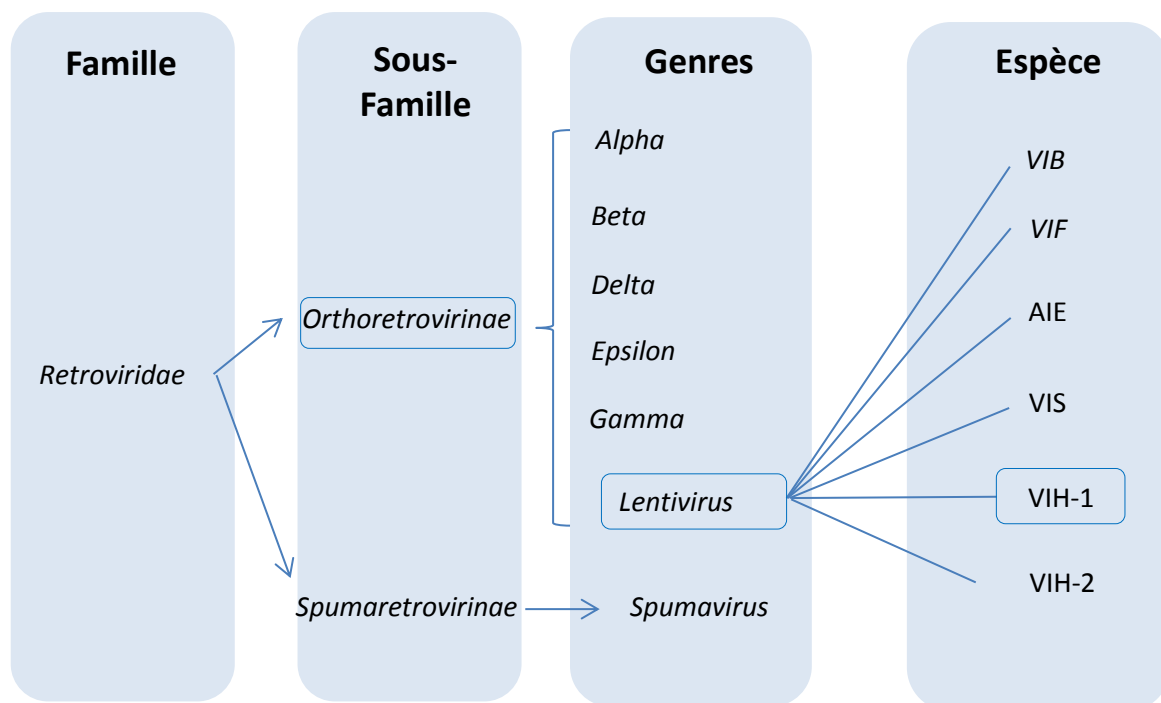


Figure 1 : Taxonomie du VIH présentée par le comité international de taxonomie des virus, 2013.

I.1.2 Historique

La première infection par le VIH a été observée chez des jeunes homosexuels en 1981 aux États-Unis. Cette infection a été décrite par l'apparition d'infections rares telle que la pneumopathie et des tumeurs touchant les personnes âgées telle que le sarcome de Kaposi (5,6). Ces maladies rares ont été corrélées à une diminution du nombre des lymphocytes T CD4⁺ induisant un déficit immunitaire.

En 1983, un virus était isolé à l'institut Pasteur (Paris), à partir des ganglions lymphatique d'un patient atteint la lymphoadénopathie cervicale ; ce virus est alors nommé LAV (Lymphadeno Associated Virus) (7). Puis en 1984 un autre groupe de recherche aux États-Unis a annoncé l'isolement d'un nouveau rétrovirus nommé HTLV-III (Human T-cell lymphotropic Virus type III) en le décrivant comme responsable du SIDA, ce virus s'est révélé plus tard être identique au LAV (8).

En 1986, Le comité international de la nomenclature des virus et de la vaxonomie (ICTV) a donné à ce virus le nom du VIH. De plus, en 1986 un nouveau lentivirus similaire au VIH a été isolé et nommé VIH-2 (8,9).

I.1.3 Phylogénie et diversité génétique du VIH

Deux souches de VIH ont donc été identifiées : VIH-1 et VIH-2 qui se différencient par leurs distributions géographiques, leurs infectivité et leurs génotypes. On parle de pandémie pour le VIH-1 et d'endémie pour le VIH-2 moins pathogène et principalement localisé en Afrique de l'Ouest.

L'analyse des séquences génétiques des isolats viraux du VIH-1 montre une grande diversité de souches virales. Ces différentes souches sont classées en quatre groupes phylogénétiques pour lesquels il s'agit de quatre transmissions indépendantes du virus simien vers l'humain :

-Groupe M, représente 90% des infections virales, lui-même divisé en 9 sous-groupes (A, B, C, D, F, G, H, J et K). Il existe également de nombreuses formes recombinantes résultant de co-infections par plusieurs sous-groupes et les souches résultantes sont appelées souches mosaïques.

-Groupe O, représente 65% d'homologie avec le groupe M et est responsable de moins de 1% des infections virales isolées en Afrique centrale (Gabon, Cameroun et Guinée équatorial) (10).

-Groupe N, isolé au Cameroun (11), ce groupe est fortement apparenté au SIV qui infecte les Chimpanzés (12)

-Groupe P, découvert en France chez une femme camerounaise, ce virus a été isolé au Cameroun (13). Ce groupe présente des similarités avec le SIV des Chimpanzés. Depuis ce jour d'autres isolats du groupe P ont été identifiés aux États-Unis dans des prélèvements réalisés chez des personnes provenant du Cameroun (10).

Pour le VIH-2, sept groupes (A-G) ont été identifiés parmi lesquels le groupe A qui est responsable de la majorité des infections (14).

Depuis le début de l'épidémie, plus que 78 millions de personnes ont été infectées et 39 millions décédées des suites de cette infection (chiffre UNAIDS-The Gap reporter 2014). De plus, selon l'Organisation mondiale de santé (OMS), cette maladie se situe principalement en Afrique (25 millions personnes vivant avec le VIH en Afrique sub-saharienne sur les 35 millions de personnes recensées) où le taux de mortalité est le plus élevé.

I.1.4 Mode de transmission

Le virus d'immunodéficience humaine est présent dans tous les liquides biologiques des personnes infectées. On le trouve dans le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel.

Trois voies de transmission principales ont été identifiées.

- La voie sexuelle qui présente 80% des transmissions du VIH et qui peut se faire par des rapports hétérosexuels ou homosexuels (15).

- La voie sanguine, responsable de 5% des transmissions virales. Cela arrive lors de partage avec une ou plusieurs personnes du matériel d'injection (aiguilles, seringues) chez les toxicomanes, en cas d'accident d'exposition (pour le soignant) et au cours de transfusion sanguine ou transplantation (16).

- La transmission mère-enfant responsable de 2% de transmission virale, ce phénomène a lieu durant la grossesse, lors de l'accouchement ou pendant l'allaitement. En cas d'absence de traitement, le taux de transmission mère-enfant peut atteindre 42% (17).

I.1.5 Infection par le VIH

L'infection par le VIH-1 se fait en trois étapes :

1- Infection aigue ou primo infection

Cette phase est initiée par une phase pendant laquelle le virus est indétectable (7 à 10 jours), le virus se répliquerait alors activement sur le lieu de contamination. La primo infection est ensuite associée à une réplication active du virus dans l'organisme ce qui aboutit à une chute rapide mais transitoire des lymphocytes T CD_4^+ circulants et des lymphocytes T CD_4^+ mémoires associés aux muqueuses (18). Le virus se retrouve alors dans les principaux organes lymphoïdes (rate, ganglions, rate...) qui deviennent alors des réservoirs au virus. Quelques semaines après le contact avec le virus (3 à 6 semaines) le système immunitaire est stimulé avec une production d'anti-corps anti-VIH et une augmentation de l'activité des lymphocytes T CD_4^+ ce qui permet une diminution de la charge virale et une stabilisation du nombre du virus dans l'organisme. Les symptômes d'une primo infection, chez la plupart des personnes, sont semblables à ceux de la grippe, d'une mononucléose (fièvre, fatigue, maux de gorge, éruption cutanée). Le diagnostic est effectué par des tests sérologiques suivis par la détection de l'ARN viral ou de l'antigène p24 par western blot (19).

2- Phase asymptomatique

La phase asymptomatique est d'une durée variable, d'un individu à l'autre. Deux types d'individus sont identifiés selon la durée de progression de l'infection, les progresseurs rapides et les progresseurs lents dont la durée d'infection peut aller d'une à deux années ou s'étendre plus de 10 ans pour les longs termes. Cette phase est caractérisée par une faible réplication virale dans les ganglions lymphatiques mais néanmoins suffisante pour entraîner une lente et constante diminution du nombre de CD_4^+ jusqu'à une valeur inférieure à la normale (20).

3- La phase symptomatique ou SIDA

Une accélération de la déplétion en lymphocytes CD_4^+ périphérique met fin à la phase asymptomatique de l'infection et annonce la phase du SIDA. Cette phase est déclarée lorsque la charge virale dépasse les 40 000 copies /mL de sang et le nombre de lymphocyte T chute à moins de 200 cellules/ μ L (valeur normale entre 600-1200 cellules/ μ L). Il y a donc épuisement du système immunitaire et apparition de nombreuses infections opportunistes d'origine bactérienne, fongiques, parasitaire ou virale, ainsi que des complications tumorales tels que le sarcome de Kaposi et la pneumopathie, à terme létales sans traitement.

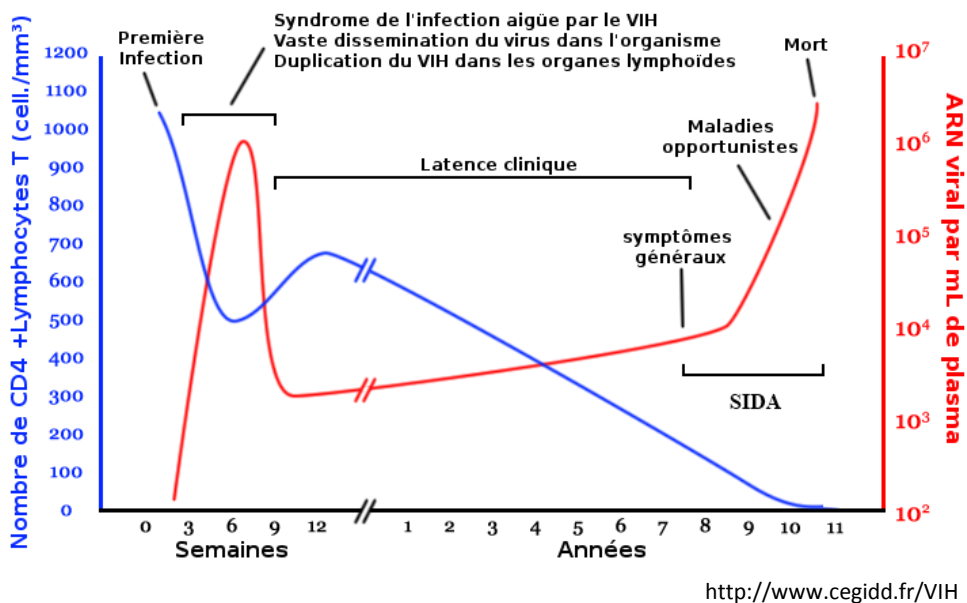


Figure 2 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1. L'infection est caractérisée par 3 phases : primo infection, infection clinique et le SIDA (figure adapté du centre de dépistage et diagnostic). La ligne bleue correspond à l'évolution du taux de lymphocytes T CD_4^+ et la ligne rouge correspond à la charge virale plasmatique.

I.2 La structure du VIH-1

I.2.1 structure de la particule virale

La particule virale du VIH a été observée pour la première fois en 1987 par microscopie électronique (21). Elle a une forme sphérique de 80 à 120 nm de diamètre. Elle est formée d'une enveloppe externe constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire à laquelle sont associées les glycoprotéines de surface gp120 et les glycoprotéines transmembranaires gp41 associées en trimère (22). Sous cette membrane se trouve la matrice et la capside virale de forme conique. Cette capside est composée de protéines de capside arrangées sous forme d'hexamères et de pentamères (CA), et contient le génome viral, lui-même formé de deux molécules d'ARN de 9.2 kb protégé par protéine de la nucléocapside (NCp7). De plus la capside abrite les enzymes virales (reverse transcriptase, intégrase et protéase) et les protéines auxiliaires (Vif, Vpr et Nef) (23). Un grand nombre d'acides nucléiques et protéines cellulaires sont encapsidés dans la particule virale (24) telle que l'ARNt^{Lys3} (25), APOBEC3G (26) et Staufen (27)

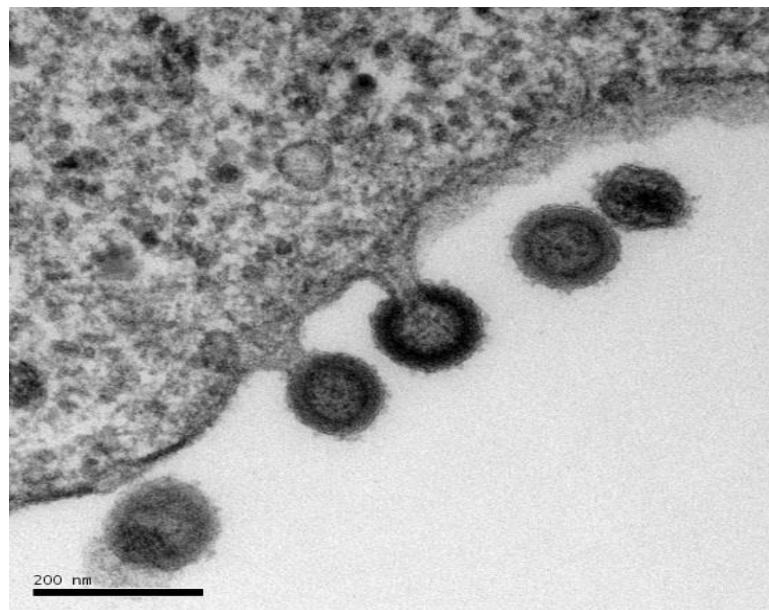


Figure 3: VIH en cour de bourgeonnement, vu par microscopie électronique (Roingeard et al, communication personnelle)

I.2.2 Le génome viral

I.2.2.1 L'ARN viral

Le génome du VIH est constitué de deux copies d'ARN monocaténaire d'environ 9.2 Kb de polarité positive et liée de façon non-covalente en leurs extrémités 5' (28). De plus, ces deux molécules d'ARN sont produites suite à la transcription par l'ARN polymérase cellulaire du provirus intégré dans le génome de la cellule infectée, et est coiffé en 5' et polyadénilé en 3' (29).

Après une série d'épissage, les ARN viraux codent pour les polyprotéines Gag et Gag-Pol, Env, ainsi que pour plusieurs protéines régulatrices (Tat, Rev, Vpr, Vpu, Vif). Ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'expression du génome viral et dans le pouvoir infectieux du virus. Ces régions codantes sont entourées en 5' et 3' par des régions non-codantes appelées 5'-et 3'-UTR (*UTR = UnTranslated Region*) (2).

Les régions non codantes

La région 5'-UTR est la partie la plus conservée du génome viral. On retrouve dans cette région différents motifs en tige-boucle impliqués dans les étapes du cycle réplcatif tel que la transcription, la reverse transcription, l'épissage, la dimérisation et l'encapsidation du génome virale dans la particule virale naissante (30).

La région 5'-UTR comporte différents domaines : la séquence R (*Repeat*), U5, PBS (*Primer Binding Site*) et le signal d'encapsidation Psi (Ψ). De son côté, la région 3'-UTR comporte la séquence U3 et R

La séquence R en 5' et 3'

La région R est composée de deux séquences en tige-boucle (TAR et la séquence polyA) ayant comme fonction (Figure 4) :

- La tige-boucle TAR (*Trans-activating Response Element*) composée de 57 nucléotides. Cible de la protéine virale Tat, cette séquence joue un rôle essentiel en 5' dans l'activation transcriptionnelle du génome proviral. De plus TAR joue un rôle dans la transcription inverse de l'ARNv lors des sauts de brins (31-34)

- La séquence polyA contenant le signal de polyadénylation (AAUAAA) induisant l'addition d'une queue polyA en 3' de la séquence R. Ce motif n'est fonctionnel qu'en 3' de l'ARNv permettant le clivage du transcrit (35).

La séquence U5

La séquence U5, précède la région PBS (*Primer Binding Site*), est formé de 85 nucléotides constitue la première séquence transcrite lors de la reverse transcription. Cette séquence est capable de s'hybrider au codon AUG du gène codant pour gag permettant ainsi la formation d'une structure nommé BMH (*Branched Multiple Hairpin*) (Figure 4) (36).

La séquence PBS (Primer Binding Site)

Cette séquence de 18 nucléotides est située en 3' d'U5. La séquence PBS s'apparie totalement avec l'extrémité 3' de l'ARNt^{Lys3} cellulaire utilisé comme amorce lors de la reverse transcription de l'ARNv en ADNv (37).

Le signal d'encapsulation Psi (Ψ)

Localisé entre PBS et le codon d'initiation de la traduction du gène Gag. On retrouve dans cette région trois séquences en tige-boucle complètes (SL1-SL3) et le début d'une tige-boucle (SL4) portant l'AUG de Gag (38).

- SL1 encore appelée DIS (*dimerisation Initiation Site*), une séquence palindromique de six nucléotides (GUGCAC), joue un rôle dans la dimérisation de l'ARNv via une interaction boucle-boucle avec un DIS d'un autre ARNv (39,40)
- SL2, un site donneur d'épissage (*SD*), le nombre important de sites donneur ou accepteur d'épissage permet de générer plus de 30 ARN messagers différents responsables des différentes protéines du VIH-1.
- SL3 ou Psi (Ψ), le signal d'encapsulation est essentiel à l'encapsulation du génome viral lors de l'assemblage de la particule virale. Cette séquence est très conservée parmi les différentes souches du VIH-1 (41)
- SL4 contient le codon d'initiation de la traduction du gène *gag*.

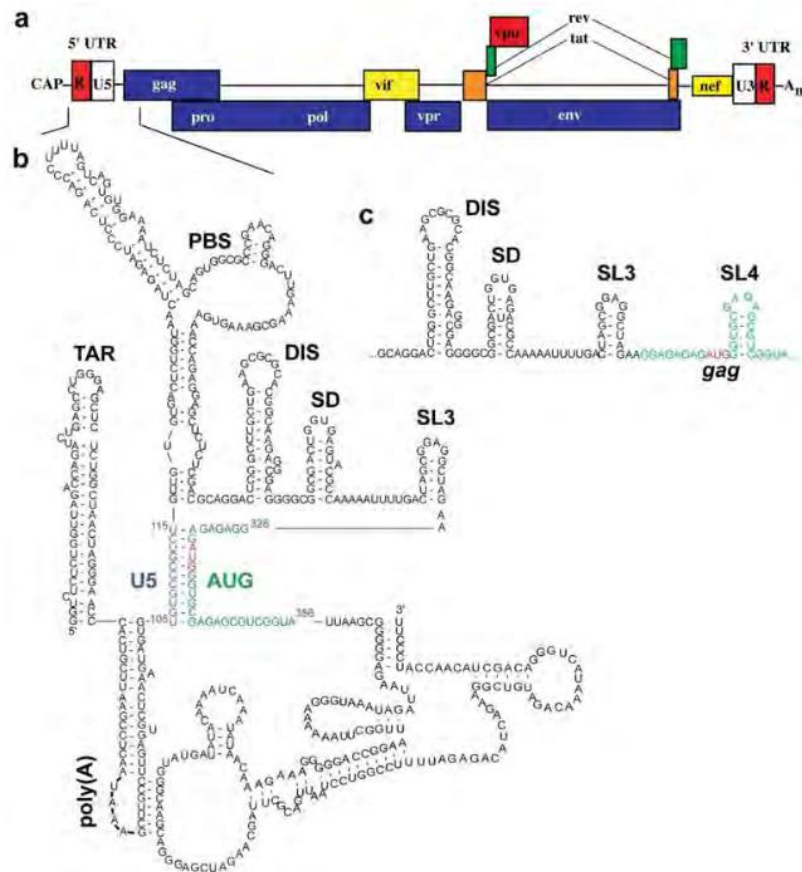


Figure 4 : Structure secondaire de la région 5' du VIH. a) Génome du VIH-1, b) une des structures prédites du VIH-1 montrant l'interaction à distance entre U5 et le codon AUG de Gag, c) structure alternative montrant la structure en tige-boucle de SL4 (adapté de Spriggs et al, 2008 (36))

La séquence RRE (Rev Responsive Element)

Séquence de 234 nucléotides située dans le gène d'*env*. Cette séquence est impliquée dans l'export nucléaire de l'ARN mono ou non-épissé suite à un mécanisme nécessitant l'interaction avec la protéine Rev et la machinerie de transport de la cellule hôte (42).

La séquence PPT (Poly Purine Tract) et la PPTc (Poly Purine Tract central)

La PPT et PPTc sont des domaines riches en purine du génome viral. La PPT se situe en 3' du génome viral, tandis que la PPTc a une localisation centrale spécifiquement dans le cadre ouvert de lecture du gène *pol*. Ces séquences sont résistantes à l'activité de la RNase H de la reverse transcriptase et servent d'amorces pour la synthèse du brin (+) de l'ADN proviral. La séquence PPTc est responsable de la formation de structure Flap du complexe de pré-intégration (PIC) qui joue un rôle important dans l'import nucléaire du PIC (43,44)

La région 3'

La région 3' contient des signaux nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral et un signal de polyadénylation dans R (45)

I.2.2.2 L'ADN proviral

Le génome du VIH est formé d'une partie centrale codant pour les protéines de structure, les enzymes et les protéines auxiliaires. Cette région est entourée de deux régions non codantes en 5' et 3' (Figure 5).

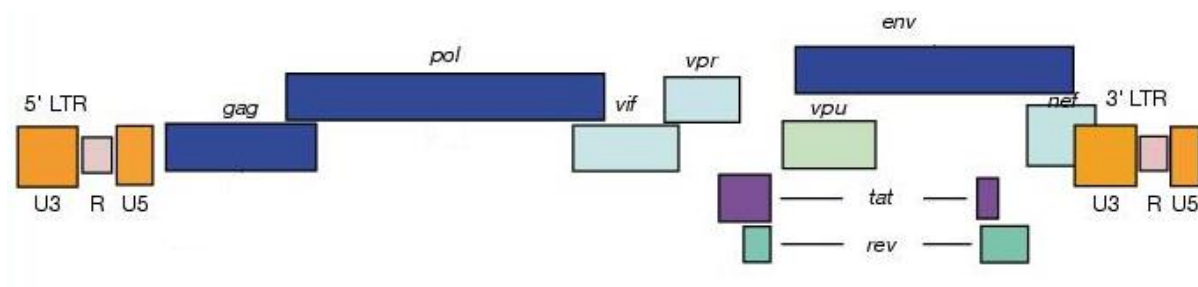


Figure 5 : Représentation schématique de l'ADN proviral du VIH-1. Adapté de Larrouy et al, 2010 (46)

Les régions non-codantes

L'ADN proviral est entouré de deux séquences non-codantes identiques, les LTR (*Long Terminal Repeat*) importantes pour l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte et sa transcription. Chaque LTR se divise en séquence U3, R et U5.

La région U3 contient les signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire, cette région est divisée en trois parties : 1-Le core du promoteur contenant trois sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1, une boîte TATA. Cette partie permet la transcription de l'ADN viral à un taux basal .2- un domaine activateur contenant deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF-κB. 3- un domaine modulateur qui lie plusieurs facteurs transcriptionnels cellulaires (47,48).

Les régions codantes

- Le gène de *gag* (groupe spécifique d'antigène)

Le gène *gag* code pour une polyprotéine de 55KDa appelée Pr55^{Gag}. Après clivage par la protéase virale, Gag donne naissance à plusieurs protéines : la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24), la nucléocapside (NCp7, p7) et le peptide p6. Par ailleurs, deux peptides SP1 et SP2 sont générés de part et d'autre de la région codante de la NCp7 (49,50).

- Le gène *pol* (polymérase)

Lors de la traduction de Gag, un décalage du cadre de lecture au niveau de la région codante de p6 donne naissance à la polyprotéine Gag-Pol (51). Celle-ci sera ensuite maturée pour donner naissance à la protéase (PR), la reverse transcriptase (RT) et l'intégrase (IN).

- Le gène *env* (enveloppe)

Ce gène code pour une polyprotéine, Pr160^{env}, transmembranaire dont sa maturation se passe au niveau du cytoplasme. La protéine Env est clivée par les protéases cellulaires et génère une glycoprotéine de surface la gp120 et une glycoprotéine transmembranaire la gp41. Ces deux glycoprotéines sont impliquées dans l'interaction virus-cellule hôte.

Le VIH possède des gènes situés de part et d'autre du gène *env*, codent pour des protéines régulatrices (Tat, Rev) et des protéines auxiliaires (Nef, Vif, Vpu et Vpr) (49). Les différentes protéines du VIH ainsi que leurs fonctions seront développées ci-dessous.

I.2.3 Les protéines Virales

I.2.3.1 Les protéines d'enveloppe

Le gène *env* code pour une polyprotéine glycosylée, gp160^{env}, synthétisée au niveau de réticulum endoplasmique, avant d'être transportée à l'appareil de Golgi de la cellule hôte où elle sera clivée par une protéase cellulaire. L'hydrolyse de cette polyprotéine par les peptidases cellulaires donne une glycoprotéine de surface gp120 (SU) et une glycoprotéine

transmembranaire gp41 (TM) (52). Ces deux glycoprotéines s'associent sous forme de trimères d'hétérodimères gp120/gp41 qui lors du bourgeonnement sont incorporés dans l'enveloppe virale, exposés à la surface du virus et forment les spicules observés par microscopie (53,54).

- **La glycoprotéine de surface gp120**

Composée de 480 acides aminés (a.a), elle permet au virion d'interagir avec les récepteurs CD₄ présents à la surface de la cellule hôte (55). La gp120 contient 20 à 35 sites de glycosylation et 9 ponts disulfures. Elle est composée de cinq régions variables (V1 à V5) et cinq régions conservées (C1 à C5) (56). Les deux boucles V1/V2 sont les plus variables et protègent la boucle V3 des anticorps neutralisants. Elle joue un rôle majeur dans la fusion et le tropisme viral (57). Les régions C1 et C5 constituent le site de liaison avec la gp41 et les boucles C2, C3 et C4 abritent les domaines de liaison au CD4.

- **La glycoprotéine transmembranaire gp41**

Composé de 345 a.a, la gp41 est plus conservée que la gp120. Elle est formée de trois domaines : Un domaine N-terminal extracellulaire aussi appelé ectodomaine, une région transmembranaire et un domaine C-terminal intracytoplasmique. Cette protéine est impliquée dans l'ancrage des spicules dans la membrane cellulaire, dans l'incorporation de l'enveloppe dans les particules virales, et dans la fusion entre membranes cellulaire et virale. De plus, cette protéine est responsable de la multimérisation des protéines d'enveloppe (22).

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

Les précurseurs Gag (Pr55^{Gag}) et Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}) proviennent de la traduction du même ARNm non épissé. En effet, Pr55^{Gag} est produit suite à la lecture du premier codon d'initiation (dans la boucle SL4) jusqu'au premier codon stop. Pr160^{Gag-Pol} est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture des ribosomes en fin de traduction de Pr55^{Gag} qui rend silencieux le premier codon stop. Ce décalage se fait au niveau d'une séquence "de glissement" associée à une tige-boucle qui permet le décalage d'un nucléotide en 5' du cadre de lecture (51). Ce glissement se fait avec une efficacité de 5% générant un rapport Gag : Gag-Pol de 20 : 1, ce rapport est critique pour la propagation du virus. Après avoir être

exprimé, les précurseurs Gag et Gag-Pol seront clivés par la protéase virale et abouti à d'autres peptides : matrice, capsid, nucléocapsid, p6 et aux enzymes virales.

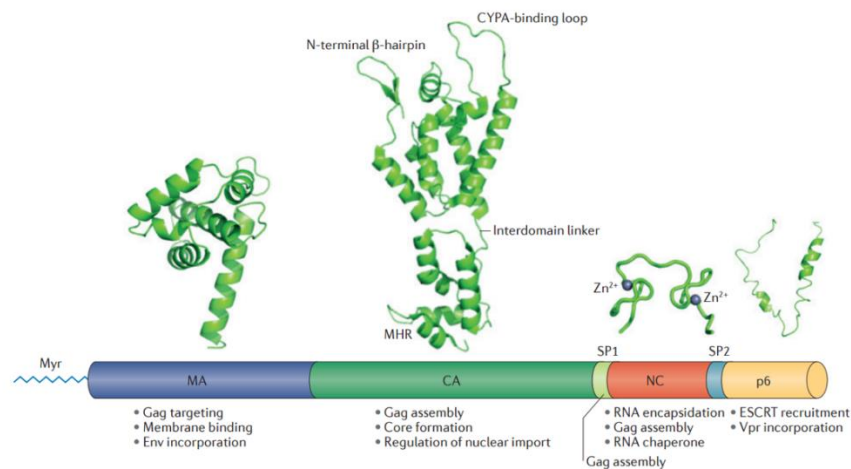


Figure 6 : Schéma montrant la structure et fonction de la polyprotéine Gag. Des domaines de Gag sont présentés en différentes couleurs : Matrice (MA), capsid (CA), nucléocapsid (NC) et p6. De plus, la fonction de chaque domaine est décrite : La matrice impliquée dans l'adressage de Gag à la membrane plasmique et dans l'incorporation de la protéine Env, la capsid joue un rôle dans l'assemblage de Gag et la formation du core du virus du VIH, la NC via ces deux domaines dactyles impliqué dans l'encapsidation de l'ARNv et le domaine p6 recrute les protéines de la famille ESCRT et permet une incorporation de la protéine Vpr dans le virion, Freed et al, 2015 (58).

1.2.3.2.1 La matrice (MA, p17)

La matrice est une protéine de 132 a.a (17 kDa), intervient dans plusieurs étapes du cycle virale (dans les phases tardives et précoces). Ainsi, dans la particule virale la matrice tapisse la surface interne du virion et, au sein de Gag, elle permet l'adressage du précurseur vers la membrane plasmique où aura lieu l'assemblage de la particule virale. Pour cet adressage deux domaines de la matrice semblent impliqués. Un résidu glycine qui est myristilé à l'extrémité N-terminal ce qui permet à la matrice de s'ancrer dans la bicouche lipidique de type PI(4,5)P₂. D'autre part, une plateforme basique entre les a.a 26 et 32 appelée HBR (*highly Basic Region*) qui facilite l'ancrage de Gag via des interactions électrostatiques avec les phospholipides de la membrane plasmique (59,60). Dans les deux cas, des mutations touchant la plateforme basique ou le site de myristoylation induisent un défaut d'adressage de Gag à la membrane plasmique (61).

D'un point de vue structural, la matrice s'organise en structure globulaire formée de cinq hélices α et trois feuillets β . Ainsi que le carboxyle terminal de l'hélice α sera exposé en dehors de la structure globulaire permettant la liaison entre la MA et le domaine 1 de la CA lors de l'assemblage viral (58).

1.2.3.2.2 La Capside (CA, p24)

La capsid est une protéine de 231 a.a (24 kDa) responsable de la capsid virale. Environ 2000 molécules de CA s'associent en 250 hexamères et 12 pentamères pour former la structure fullerène qui caractérise les particules d'HIV (62). Cette protéine est formée de deux domaines NTD en N-terminal et CTD en C-terminal reliés par un "linker" ou portion flexible. Une boucle dans la NTD interagit avec la cyclophiline A et permet l'encapsulation de cette dernière dans les particules virales naissantes (63). Ainsi, une diminution de l'infection est observée en cas d'inhibition d'incorporation de la cyclophiline A (64). Il semble que cette protéine soit capable de modifier la structure de la capsid et faciliter l'étape de décapsidation (65).

Ensuite, le CTD présente le domaine de dimérisation de la capsid qui contribue aux interactions Gag-Gag requises lors de l'assemblage (66). Finalement, plusieurs études basées sur l'ARNi ont montré que les protéines Nup160, Nup153 sont des facteurs indispensables à l'infection par le VIH et une mutation au niveau de la capsid diminue l'expression de ces protéines et l'infection virale (67).

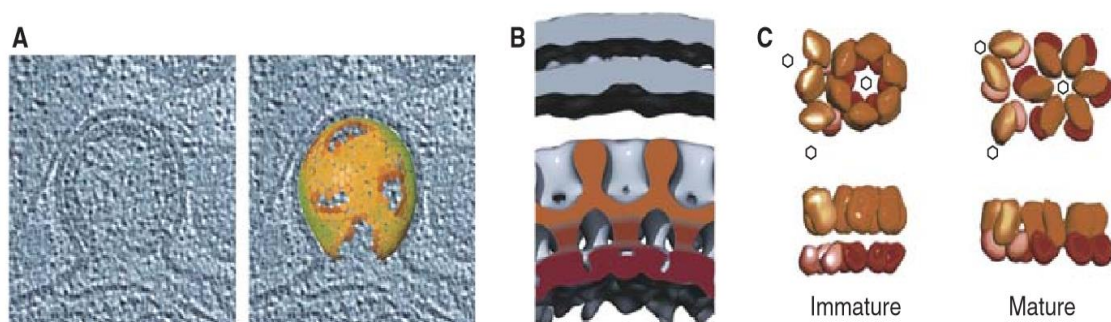


Figure 7 : Assemblage et structure du virus VIH-1 immature. A) à gauche une image en microscopie électronique montrant le bourgeonnement de la particule virale et à droite la distribution de Gag dans le virion (la couleur brune montre une petite concentration de Gag et la couleur verte montre une grande concentration de Gag). B) structure de Gag au sein de la particule virale immature (la couleur rouge

représente le domaine NC et la couleur orange la capside). C) représentation schématique du réarrangement de la capside avant et après maturation de la particule virale (38).

1.2.3.2.3 La nucléocapside (NCp7)

La forme mature de la NCp7 est générée suite à une série de clivages protéolytiques médiés par la protéase virale. Le clivage initial en aval de SP1 donne naissance à la NCp15, peptide qui contient la NCp7, SP2 et p6. La NCp15 à son tour sera clivée par la protéase et donne naissance à la NCp9 (NCp7 avec le peptide SP2 attaché) (Figure 8) (68). Enfin le dernier clivage libère la NCp7, ce peptide est constitué de deux motifs dactyles de type CysX4CysX2HisX4Cys (CCHC) appelés doigts de zinc car ils lient le zinc avec une très forte affinité (69) (Figure 9). Ce motif, constituant les doigts de zinc, est très conservé (70), sa liaison au zinc permet la structuration des doigts et le passage d'une forme aléatoire à une forme structurée (71,72).

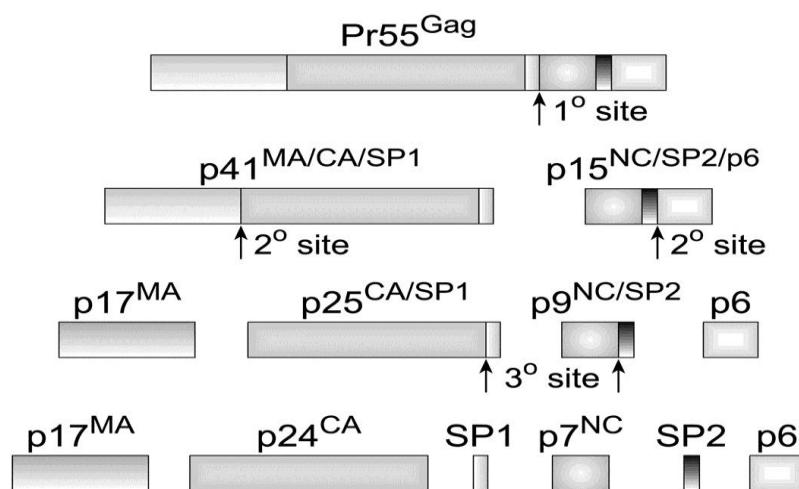


Figure 8 : Clivage de la protéine Gag par la protéase virale chez VIH-1 (73).

Cette liaison du zinc impose un repliement du doigt autour de l'ion Zn^{2+} et une proximité spatiale des différents résidus suite à la conformation du pont basique (29 RAPRKKG) liant les deux motifs dactyles. Cette organisation conduit à un rapprochement des résidus Val¹³, Phe¹⁶, Thr²⁴, Ala²⁵, Trp³⁷ et Met⁴⁶ constituant un plateau hydrophobe à la surface de la NCp7 (71,74). Par ailleurs, cela permet aussi aux résidus basiques Lys¹⁴, Lys²⁰, Lys²⁶, Arg²⁹, Lys³⁸ et Arg³² des domaines dactyles ou entourant les domaines dactyles de se retrouver alors proches des résidus aromatiques Phe¹⁶ et Trp³⁷. De nombreuses études ont montré que la

mutation des doigts de zinc à un effet négatif sur la réplication virale. Par exemple, une substitution de l'His²³ par une Cys conduit à la formation des particules virales non infectieuses (75,76). De plus, une mutation des résidus Phe¹⁶ ou Trp³⁷ rend également le virus non infectieux (77).

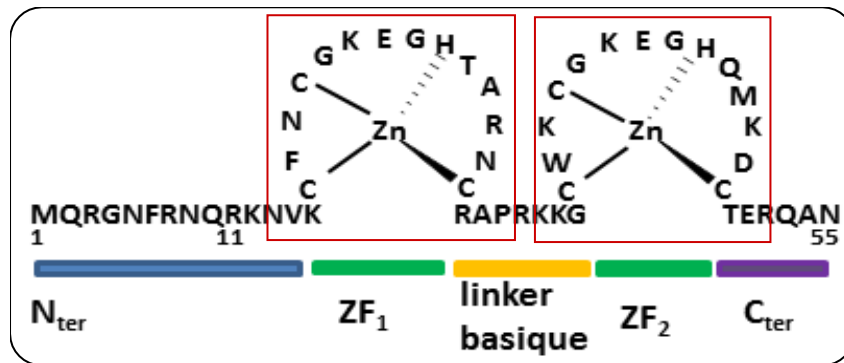


Figure 9 : Schéma représentant la séquence de la NCp7

De plus, la flexibilité de la structure de la NC permet plusieurs types d'interactions. Dans le complexe entre le domaine NCp7 (11-55) et l'ARN en tige boucle SL2, les deux guanines (en bleue et jaune, Figure 10, b) sont enfoncées profondément dans le plateau hydrophobe formé par les doigts de zinc (78). Inversement, la structure RMN du domaine NCp7 (11-55) avec (-) PBS (Figure 10, c) et mini cTAR (Figure 10, d) montrent que seule la guanine en jaune est bien insérée dans la poche hydrophobe du deuxième doigt de zinc (ZF2) (79,80). Enfin, et de manière très intéressante, l'orientation de la NC par rapport à l'AN est inversée lors d'une interaction entre la NC et les ARN ou entre la NC et les ADN (81).

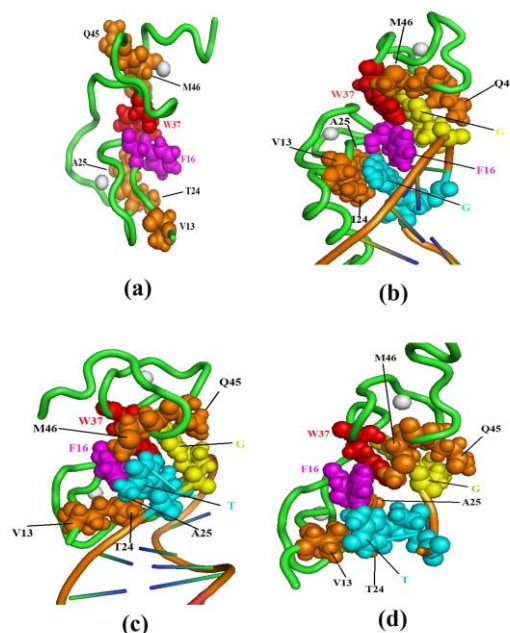


Figure 10 : (a, b) structure RMN de la NCp7 libre du VIH-1 et de la NCp7 en interaction avec PBS (c) ou mini cTAR (d) (81).

Ainsi, ce peptide interagit avec une grande variété d'acides nucléiques avec une affinité de l'ordre du micro molaire (82-86). Si la NCp7 lie les AN d'une façon non-spécifique, la littérature a décrit des sites de liaison préférentielle pour la NCp7 qui sont des séquences simple brin riche en UG- et TG- (84,85,87,88) les séquences GXG au sein des boucles simples brins (78,89) ou des séquences d'ARN localisées dans le domaine Ψ (90-93). Ce type de liaison spécifique nécessite la présence simultanée des deux doigts de zinc et notamment des acides aminés Ph¹⁶ et Trp³⁷.

La NCp7 possède de nombreux rôles dans le cycle viral :

1. Protection de l'ARN viral contre la dégradation par les nucléases. La protéine agirait donc comme une protéine chaperonne. (94,95). De plus, la NCp7 possède une activité chaperonne des acides nucléiques qui sera développée ultérieurement dans le chapitre activité chaperonne des acides nucléiques page 46.
2. Encapsidation de l'ARN viral. La NCp7 présenterait, sous forme d'un domaine de Gag, à une forte affinité pour différentes séquences de la région U5 (90,91) et notamment pour la SL1 (96). Cette interaction entre les doigts de zinc de la NCp7 et ces domaines serait suivi d'un adressage du génome viral vers la membrane

plasmique pour être encapsidé dans la particule virale naissante (91) selon un mécanisme peu connu (38).

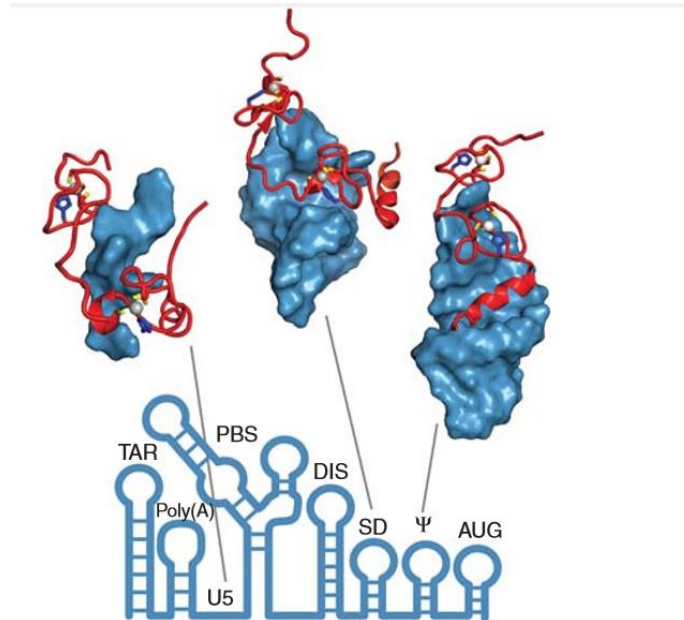


Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine NCp7 du VIH-1 et l'UTR du génome virale. La figure du bas représente la structure secondaire du 5' UTR contenant les séquences en tiges-boucles, De plus la figure du haut représente trois différents complexes entre la NCp7 (en rouge et les ions de zinc représentés en cercle gris) avec l'ARN viral (38).

1.2.3.2.4 Le peptide p6

Ce peptide de 52 a.a (5kDa) se situe à l'extrémité C-terminal de Gag et présente deux domaines importants, PTAP et LYPX_nL appelés domaines tardifs. Grâce à ces deux domaines, le peptide p6 est capable d'interagir avec plusieurs protéines cellulaires de la famille ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*) lors du bourgeonnement du virus. Le motif PTAP interagit avec la protéine TSG101 du complexe ESCRT-1 et le motif LYPX_nL interagit avec ALIX, protéine connue comme cofacteur des protéines ESCRT (97,98). Enfin, le peptide p6 interagit avec la région N-terminal de la protéine Vpr du VIH permettant son incorporation dans la particule virale naissante (99).

I.2.3.2.5 Les peptides SP1 et SP2

Le peptide SP1 (14 a.a) sépare la capside de la nucléocapside (NCp7) et contribue avec la CA à la multimérisation de Gag (100), tandis que le SP2 (16 a.a) sépare la NCp7 du p6 et ne semble pas avoir un rôle essentiel dans l'infection viral mais contribue à l'amélioration de l'activité chaperonne de la NCp7 (voir chapitre activité chaperonne des acides nucléiques page 46) (101, 102). La présence des peptides SP1 et SP2 régule le taux du clivage au niveau de sites de reconnaissance par la protéase virale donc influence la maturation de Gag et la morphogénèse virale nécessaires pour produire des virus infectieux (103).

Enfin, plusieurs partenaires cellulaires de Gag ont été identifiés et seront évoqués ultérieurement page 34.

I.2.3.3 Les protéines enzymatiques

Les protéines enzymatiques sont obtenues après maturation du précurseur Gag-Pol ($\text{Pr160}^{\text{Gag-Pol}}$)

I.2.3.3.1 La protéase (PR)

La protéase est une protéine de 99 a.a présente sous forme d'homodimère avec un site actif contenant une triade catalytique $\text{Asp}^{25}\text{-Thr}^{26}\text{-Gly}^{27}$ située à l'interface des deux sous-unités qui interagissent par leurs extrémité N- et C-terminales. La protéase est générée par un mécanisme d'auto-clivage du précurseur $\text{Pr160}^{\text{Gag-Pol}}$ (104). Cette enzyme est indispensable à la maturation du virus et son inhibition induit l'obtention des virus non-infectieux (105). L'importance de la protéase dans la maturation et le pouvoir infectieux du virus ont fait de cette protéine une cible de la thérapie antirétrovirale.

I.2.3.3.2 L'intégrase (IN)

L'intégrase est une protéine de 288 a.a (32kDa) codée par le précurseur $\text{Pr160}^{\text{Gag-Pol}}$. Cette enzyme est formée de trois domaines : *N-ter* (1-50) lie le zinc (Zn^{2+}), un domaine catalytique (55-212) et un domaine *C-ter* qui lie l'ADN. L'intégrase est présente sous forme tétramérique (forme actif) lui permettant de catalyser une série de réaction comme le *3' processing* et le transfert de brin permettant l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte. Enfin, l'intégrase forme un complexe nucléaire en interagissant avec la protéine

LEDGF/p75 qui rend l'intégrase capable de lier l'ADN viral à l'ADN cellulaire cible et d'intégrer le génome virale au sein du génome cellulaire (106-108).

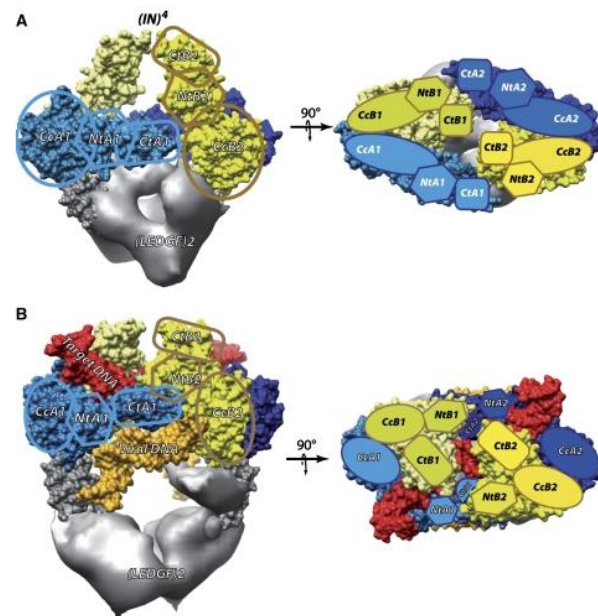


Figure 12 : schéma montrant l'organisation du complexe intégrase/LEDGF. (Michel, Crucifix et al. 2009)

Ce complexe est formé de quatre molécules d'intégrase groupées en deux dimères (Figure 12, A), associées à deux molécules de LEDGF. Ensuite, ce complexe IN/LEDGF se fixe à l'ADN viral et cellulaire (Figure 12, B : ADN cellulaire présenter en rouge et l'ADN viral en orange) et intègre le génome viral au génome de la cellule hôte.

1.2.3.3.3 La reverse transcriptase (RT)

La reverse transcriptase est une enzyme hétérodimérique composée de deux sous-unités, la p66 de 560 a.a et la p51 de 440 a.a. Elle possède trois activités enzymatiques (109):

- Activité ADN polymérase ARN dépendante
- Activité ADN polymérase ADN dépendante
- Activité ribonucléase H (RNase H) polymérase dépendante ou indépendante qui dégrade l'ARN dans les duplex ADN-ARN formés pendant la transcription inverse.

La p66 possède un domaine à activité polymérase composé de quatre sous-domaines : *fingers*, *palm*, *thumb*, *connexion* interagissant avec le domaine à activité RNase H (110). De

plus, la p51 ayant la même séquence que p66 ne possède pas d'activité polymérase ni un domaine RNase H, mais elle est capable d'interagir avec le domaine RNase H de la p66 et joue un rôle dans la structuration de la RT. Cette enzyme ne possède pas une activité correctrice ce qui permet la production de mutations (ponctuelles, insertions, délétions) (111) au sein du génome viral et explique les recombinaisons génétiques fréquemment trouvé chez le VIH-1.

I.2.3.4 Les protéines régulatrices et auxiliaires

Le génome du VIH-1 code pour des protéines régulatrices (Tat, Rev) et des protéines auxiliaires (Vpr, Nef, Vif et Vpu)

I.2.3.4.1 Tat (*Transactivator of transcription*)

La protéine Tat est impliquée dans la régulation de la transcription inverse, l'élaboration de la coiffe en 5' de l'ARNm, épissage des introns ainsi qu'elle joue un rôle dans la répression de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-1) (112). De plus Tat possède une activité de transactivation de la transcription considéré comme son activité principale qui sera détaillé dans la description du cycle virale.

I.2.3.4.2 Rev (*Regulatory of virion expression*)

La protéine Rev de 116 a.a, joue le rôle de trans-activateur post-transcriptionnel. Elle possède un signal d'export nucléaire (*NES : Nuclear Export Signal*) ainsi qu'un signal d'import nucléaire (*NLS : Nuclear Localisation Signal*) lui permettant d'intervenir dans l'export nucléaire de l'ARNm non-épissés ou mono-épissés lors de la phase tardif du cycle virale (expression du génome virale). De plus, Rev augmente la stabilité des ARNm viraux non épissés et jouerait un rôle pour favoriser l'encapsidation spécifique de l'ARN viral (113)

I.2.3.4.3 Vpr (*Viral Protein R*)

Vpr est une protéine de 96 a.a qui interagit avec la polyprotéine Gag du VIH-1 ce qui permet son encapsidation dans la particule virale (99,114). Elle est localisée dans la nucléocapside en association avec l'ARN viral (115,116). Vpr joue plusieurs rôles dans le cycle viral : impliquée dans la fidélité de la reverse transcription, trans-activation à partir du LTR et dans l'import nucléaire de l'ADN viral au sein du complexe de pré-intégration (PIC). De plus, Vpr

conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et interagit avec les protéines du port mitochondriale induisant une perméabilisation de la mitochondrie et l'apoptose de la cellule infectée.

1.2.3.4.4 Nef (*Negative regulatory factor*)

Nef est une protéine de 206 a.a, exprimée rapidement après la transcription virale ce qui souligne le rôle de cette protéine dans la propagation du virus (117). Nef augmente l'infectiosité virale (118) et favorise la survie de la cellule infecté en diminuant l'expression de plusieurs molécules de surface: 1) CD4 et CD28 pour éviter une surinfection des cellules (119), 2) les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité I et II (CMH I et CMH II) présentes sur les cellules présentatrice d'antigène (CPA) impliquées dans la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire (120,121). De plus, Nef induit une diminution de la SERINC5. Cette protéine est un facteur de restriction et en diminuant la quantité de SERINC5 encapsidée, Nef augmente l'infectivité du virus (122).

1.2.3.4.5 Vif (*Virion infectivity factor*)

Vif est une protéine de 192 a.a encapsidée dans la particule virale naissante à raison de 7 à 20 protéines par virion via une interaction avec la NCp15 de Gag (123,124). Vif joue plusieurs rôles dans le cycle viral : 1) elle stimule la dégradation par le protéasome ou au niveau traductionnel de cytidines désaminases cellulaires de la famille de APOBEC (*APO-lipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide*). Cette famille de protéine constitue une défense de la cellule hôte contre une infection virale en induisant des hyper-mutations du génome viral au cours de la rétro transcription (125). 2) Vif permet la réplication virale dans les cellules non-permissives. 3) Vif stimule la reverse transcription en augmentant, en synergie avec la NCp7, la processivité de la reverse transcriptase et en activant le premier saut inter-brin (126).

1.2.3.4.6 Vpu (*Viral protein u*)

Vpu est une protéine de 81 a.a présente uniquement dans le VIH-1 et quelques isolats de SIV (127). Vpu assure deux fonctions primaires au cycle du VIH-1 : 1) induit la dégradation via le protéasome des récepteurs CD4 synthétisés dans le réticulum endoplasmique (128). 2) Vpu favorise le bourgeonnement et la libération des particules virales à la surface des cellules

infectées, en diminuant l'action anti virale de la tetherin. En effet, la présence de Vpu semble empêcher le tetherine de se localiser au sein des régions membranaires connues comme lieu préférentiel de bourgeonnement du VIH-1 (régions sont riches en cholestérol et protéines (rafts)) ce qui facilite la libération des particules virales à la surface cellulaire (129,130).

II. Le cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle réplcatif du VIH-1 comporte plusieurs étapes :

- **Entrée** : fixation du virus à la surface de la cellule hôte et l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et les récepteurs CD₄ présents à la surface de la cellule cible. Ensuite une deuxième interaction entre la glycoprotéine de la membrane virale gp120 et un corécepteur (CCR5 ou CXCR4) aura lieu pour stabiliser la fixation du virus sur la cellule et faciliter son entrée.
- **Synthèse de l'ADN proviral** : la rétro-transcription du génome virale (ARN) en un ADN double brin suite à l'activité de la reverse transcriptase.
- **Intégration de l'ADN proviral** : suite à l'action de l'intégrase virale, l'ADN pro-viral sera intégrer dans le génome de la cellule hôte.
- **Transcription** de l'ADN proviral en ARNm et **synthèse des protéines virales** par la machinerie de traduction cellulaire.
- **Assemblage, bourgeonnement et maturation** conduisant à la formation de nouvelles particules virales infectieuses.

Ces différentes étapes seront divisées en deux phases, une précoce (entrée, transcription inverse et intégration) et une tardive (transcription, assemblage et bourgeonnement).

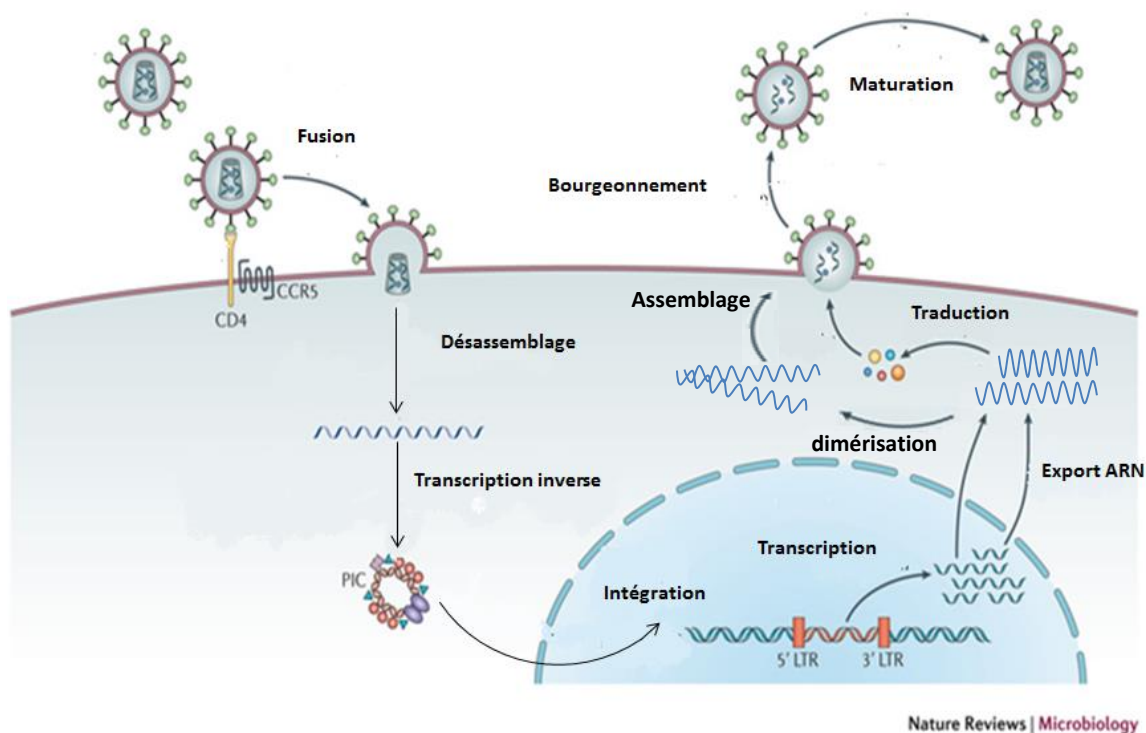


Figure 13 : cycle de réplication du VIH-1 (adapté (131))

II.1 La phase précoce de la réplication du VIH-1

II.1.1 Reconnaissance, fusion et entrée

Le VIH-1 se fixe sur la cellule hôte suite à l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe viral gp120 présente sous forme trimérique et le récepteur CD4 situé à la surface de la cellule cible. Le CD4, aussi appelé cluster de différenciation 4, est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺, monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Les déterminants moléculaires de CD4 impliqués sont situés dans le domaine D1, notamment les deux résidus F43 et R59 qui interagissent avec les résidus Q368 et V430 des domaines C3 et C4 de la gp120 (132). L'interaction entre ces deux molécules de surface induit un changement conformationnel de la gp120, permettant à cette dernière de se lier à des co-récepteurs. Plus d'une dizaine de co-récepteurs ont été identifiés, les principaux sont des récepteurs de chimiokines : CXCR4 présent à la surface des lymphocytes T, CCR5 à la surface des macrophages et cellules dendritiques. L'interaction entre les trois partenaires gp120/CD4/co-récepteur libère le domaine de la gp41 permettant la fusion entre la membrane virale et cellulaire et l'entrée du virus dans la cellule hôte. Récemment une

nouvelle voie d'entrée du VIH-1 est identifiée, il s'agit d'une transmission de cellules en cellules par l'intermédiaire de synapse virologiques (133).

Pour diminuer la capacité du virus à reconnaître sa cible une famille d'inhibiteur de fixation a été mise en place : Le *Maraviroc*, approuvé en 2007, est un inhibiteur allostérique qui interagit avec le récepteur CCR5 au niveau de la membrane cellulaire et le bloque, aboutissant à une inhibition de l'interaction de la gp120 avec le CCR5. Par ailleurs, une autre famille d'inhibiteur de fusion a été développée telle L'*enfuvirtide*. Cette molécule correspond à un peptide de 36 acides aminés connu comme inhibiteur de réarrangement structural de la glycoprotéine gp41. Cette molécule se lie à la gp41 dans le milieu extracellulaire, bloquant l'interaction et la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule cible.

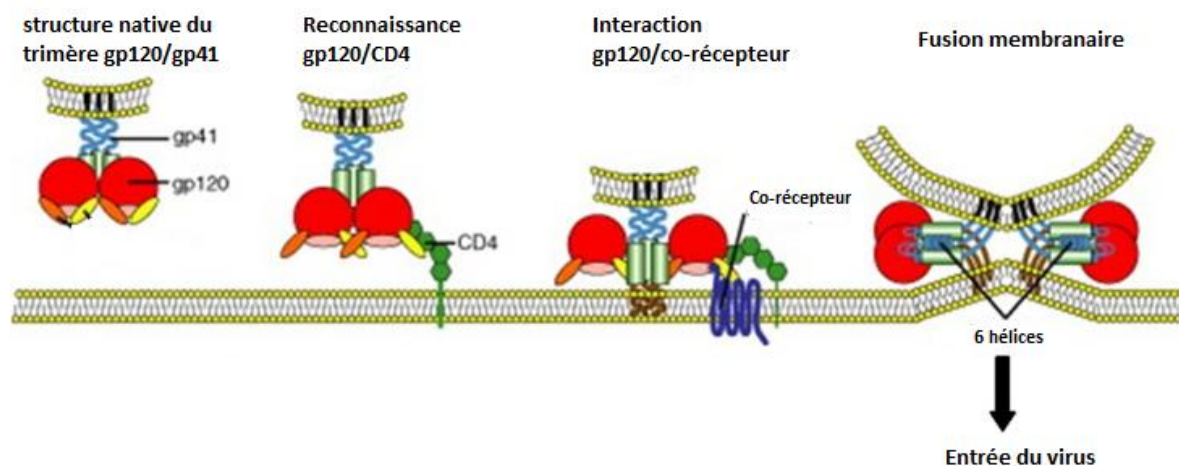


Figure 14 : représentation schématique des étapes d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible (adapté de (134))

II.1.2 Décapsidation et rétro transcription

Après fusion de la membrane virale et cellulaire le contenu de la capside virale sera libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Pour permettre l'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule infectée, l'ARN viral doit être transformé en ADN viral double brin par une étape de réverse transcription (RTion) médiée par la reverse transcriptase (RT) du VIH-1 et facilitée par la NCp7 (voir chapitre activité chaperonne des acides nucléiques page 45). Ce processus de RTion constitue une étape essentielle dans le cycle viral et nécessite deux

transferts de brin. Alors, le processus de reverse transcription peut être résumé en quatre étapes (135,136) :

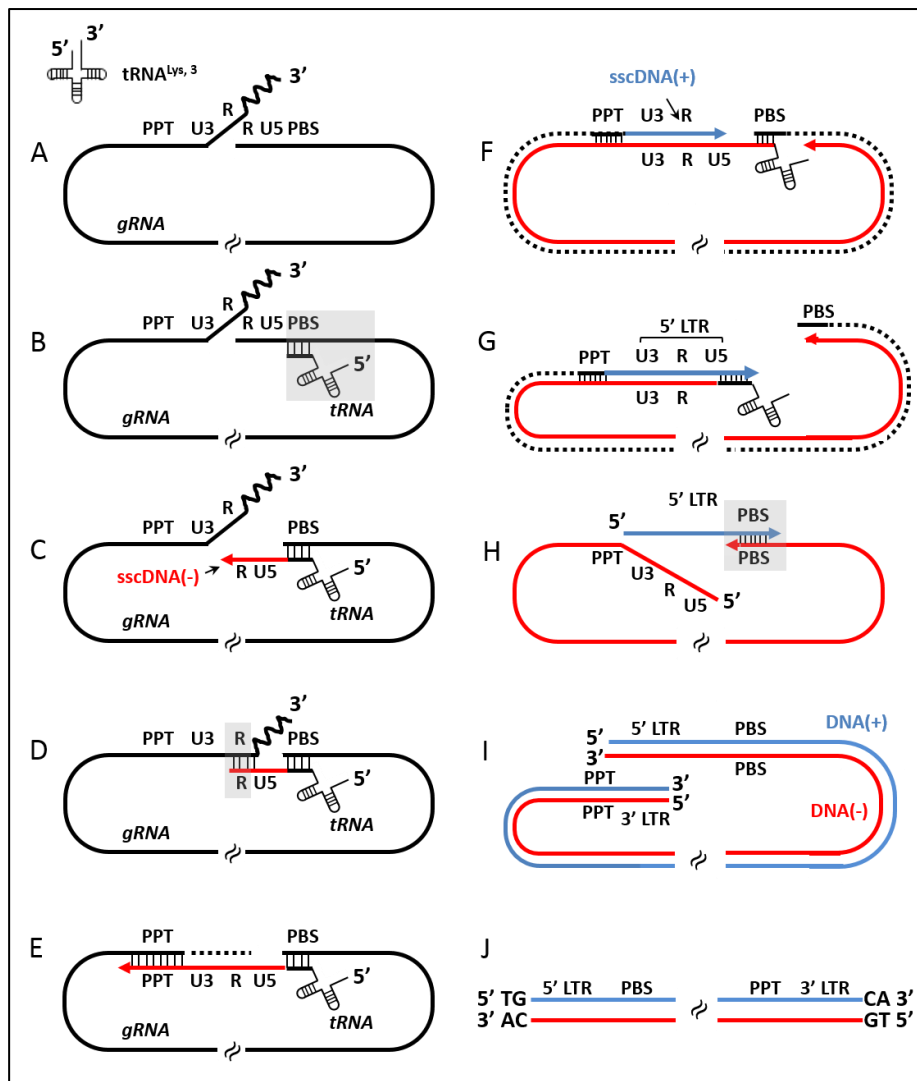


Figure 15 : schéma des principales étapes de la transcription inverse chez le VIH-1.

- 1- Synthèse du brin d'ADN "strong-stop" : ce brin d'ADN(-) est formé suite à la liaison de l'ARNt^{Lys}, qui sera utilisé comme amorce pour la reverse transcription, à la séquence PBS (*Primer Binding Site*) de l'ARN viral (Figure 15, étapes A, B et C). Cette liaison génère une séquence d'ARN double brin de 18 nucléotides. Ce complexe ARNt/ARNv sera reconnu par la RT du VIH qui a son tour débute la transcription inverse du brin d'ARN qui débute du côté 3' de l'amorce jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN, synthétisant ainsi un brin d'ADN négatif de 178 à 181 pb connu par ADN "strong-stop" (ADNss).

- 2- Premier saut de brin : dans cette étape (Figure 15, étape D) un brin d'ADN/ARN est formé ce qui nécessite une dégradation du brin d'ARN au sein de l'hétéroduplex, d'où l'intervention de la RT par son activité RNase H qui mène à la dégradation de l'ARN. Cette dégradation de l'ARN permet le transfert de l'ADNss vers l'extrémité 3' de l'ARN viral génomique. Ce transfert implique la séquence TAR et est facilité par la NCp7 du VIH.
- 3- Synthèse de l'ADN(-) : une fois le saut de brin est effectué, la synthèse du brin d'ADN se poursuit (Figure 15, étape E et F), accompagnée par la dégradation de l'ARN suite à l'activité RNase de la RT. Par contre la dégradation de l'ARN n'est pas complète, suite à la présence des séquences PPT (Poly Purine Tract) résistantes à la RNase.
- 4- Synthèse de l'ADN(+) et deuxième saut de brin (Figure 15, étape F, G et H): le duplex ADN(-)/PPT va servir comme amorce pour la synthèse du brin complémentaire d'ADN ou l'ADN(+). Cette synthèse poursuit jusqu'au 3' de l'ARNt^{Lys} qui sera ensuite dégradé par l'activité RNase H de la RT. Ensuite, l'hybridation des séquences PBS(+)/(-) constitue le deuxième saut de brin (étape H) qui va aboutir à la synthèse totale de l'ADN(+) (étape I) conduisant à la formation de l'ADN proviral double brin. A noter que, tout comme le premier saut de brin, le deuxième saut est stimulé par la NCp7.

Au vue de l'importance du processus de reverse transcription, catalysé par la reverse transcriptase, deux familles d'inhibiteurs de la reverse transcriptase ont été développés :

- Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la reverse transcriptase (INRT ou INtRT) La première classe de ces inhibiteurs a été utilisée en 1987 dans le VIH sous le nom de l'AZT, qui est un analogue de la thymine et inhibant l'activité de la reverse transcriptase (RT). Ces inhibiteurs entrent en compétition avec les nucléotides naturels lors de la synthèse de l'ADN viral ce qui permet une inhibition de la reverse transcription et l'élongation de l'ADN viral (137).
- Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la reverse transcriptase (INNRT). Les INNRT sont des inhibiteurs non compétitifs, agissent par la modification de la structure du site actif de la RT (137).

II.1.3 Transport nucléaire et intégration de l'ADN proviral

L'achèvement de la transcription conduit à l'obtention du complexe de pré-intégration ou PIC (Pre-Integration Complex) formé de l'ADN proviral, matrice, intégrase, Vpr et des protéines cellulaires telles que HMG-I(Y) (High Mobility Groupe I), BAF (Barrière to Autointegration Factor) et LEDGF/p75 (108,138,139). Le PIC est importé au noyau de la cellule par l'intermédiaire d'un mécanisme de transport actif basé sur les karyophérines α et β et les protéines Ran-GTP. De plus ce transport nécessite la présence des signaux de localisation nucléaire (NLS) des protéines matrice, intégrase et Vpr (140).

Une fois dans le noyau, le PIC sera intégré au génome cellulaire suite à une réaction catalysée par l'intégrase qui reconnaît les LTR des deux extrémités de l'ADN viral et clive un GT à chaque extrémité 3' libérant un dinucléotide CA porteur de 3'-hydroxyle. Ce processus est appelé 3' processing. Ensuite, l'intégrase catalyse par une réaction de trans-estérification l'insertion du CA-OH 3' dans le génome cellulaire. Cette insertion sera suivie par une réparation des discontinuités au niveau du site d'insertion par les enzymes cellulaires du maintien du génome (141,142). Si la réaction d'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte est catalysée par l'intégrase, l'efficacité de ce processus est augmentée suite à l'activité de différentes protéines telle que HMGI(Y), LEDGF et le NCp7 (143-145).

De multiples sites d'intégration sont présents dans le génome cellulaire et en conséquence, les cellules infectées possèdent souvent plusieurs provirus intégrés. De plus, on trouve des sites préférentiels d'intégration appelés "hot spots" qui seront activés suite à une infection cellulaire par le VIH (146,147). Enfin, suite à l'étape d'intégration, il existe une étape de latence d'une durée variable et dont les mécanismes sont mal connus.

A noter que dans la lutte contre le VIH, deux familles d'inhibiteurs ont été développées visant à inhiber l'intégrase. La première famille appelée INBI (*Integrase Binding Inhibitors*), empêche la fixation de l'ADN viral sur l'intégrase. Les INBI appartiennent à la famille des quinoléines ; molécules que l'on retrouve dans de nombreux médicaments d'origine naturelle comme la quinine qui présente une forte activité inhibitrice de l'intégrase du VIH

in vitro. La deuxième famille appelée INSTI (*Integrase Transfert Inhibitors*) inhibe la fixation de l'ADN de la cellule hôte dans le noyau, interdisant ainsi le transfert de brin.

De nos jours la thérapie antirétrovirale devient plus efficace et cela suite à la trithérapie. Cette thérapie combine trois médicaments appartenant à des classes différentes, généralement deux inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase associés à un inhibiteur de protéase ou de l'intégrase ou à un inhibiteur non nucléosidique de la reverse transcriptase (148).

II.2 Les phases tardives de la réplication du VIH-1

Le processus d'expression des gènes viraux passe par différentes étapes allant de la transcription de l'ADN proviral et épissage du transcrit primaire vers l'export nucléaire et la traduction de l'ARN messagers (ARNm).

II.2.1 Transcription de l'ADN proviral et épissage du transcrit primaire

La transcription de l'ADN viral intégré dans le génome cellulaire est la première étape d'expression des protéines virales. Cette transcription est assurée par l'ARN polymérase II cellulaire. Cette enzyme se fixe sur la région U3 du LTR spécifiquement au niveau de la boîte TATAA. En amont de cette boîte, on trouve trois séquences régulatrices (SP1) précédées de deux enhancers qui fixent le facteur de transcription NF- κ B.

La faible activité de l'ARN polymérase II donne naissance à des transcrits courts qui seront ensuite poly-adénylés en 3' et coiffés en 5'. Ces transcrits courts seront traduits en protéines régulatrices Tat, Rev, nef. La protéine Tat va ensuite activer la transcription en se fixant sur la séquence TAR (*Trans-Activation Responsive*) de l'ARN viral, permettant ainsi la stabilisation de cet ARN ce qui aide à son élongation. De plus Tat recrute différents facteurs cellulaires comme TATA-binding protéine (TBP), kinase 9 cycline dépendante (CDK9) et P-TEFb (facteur positif d'élongation de la transcription) (149-152).

La transcription du génome du VIH-1 intégré dans le génome cellulaire forme une trentaine de transcrits divisés en trois classes :

- ARN non épissé de 9 kb conduit à la formation des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol.

- ARN mono-épissé de 4 kb généré suite à l'épissage du premier intron. Cet ARN code pour les protéines Env, Vpr, Vpu et Vif.
- ARN multi-épissé de 2 kb généré après clivage de tous les introns et exprime Nef, Rev et Tat.

II.2.2 Export nucléaire des ARNm

L'export nucléaire des ARNm est orchestré par la protéine virale Rev. L'ARNm multi-épissé, ayant une taille inférieure aux pores nucléaires, sera capable de sortir du noyau de la cellule, tandis que l'export nucléaire des ARNm mono-épissé ou non épissé nécessite une interaction entre le Rev et l'ARN (153). Pour cela, la protéine REV possède un domaine riche en arginine qui interagit spécifiquement avec la séquence RRE (Rev Responsive Element) localisée dans le gène env de l'ARNm mono ou non-épissé. Ce motif correspond aussi à une séquence NLS (Nuclear localization signal) et un signal NES (Nuclear Export Signal) et permet à Rev d'agir dans un cycle répété d'import-export (154), induisant à l'export de l'ARNm durant chaque cycle. D'un point de vue mécanistique, la multimérisation de Rev autour du RRE masque le signal NLS et dévoile le NES permettant ainsi au complexe Rev-ARN d'interagir avec des facteurs d'exports nucléaires comme CRM1 et Ran GTP/GDP.

II.2.3 Traduction des ARNm

La traduction des ARNm viraux dépend de la machinerie de traduction cellulaire de type Cap dépendante et IRES dépendante (155). Une fois exportés vers le cytoplasme, les ARNm mono-épissés seront traduits en protéine Env, Vpr, Vpu, Vif et en précurseur polyprotéique gp160 à l'origine des glycoprotéines gp120 et gp41. De leur côté, les ARNm non-épissés seront traduits en précurseur Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} qui sont à la base de toutes les protéines structurales, et les enzymes du virus.

Plus récemment, un mécanisme dépendant d'IRES (Internal Ribosome Entry Site) a été décrit par plusieurs équipes (155). L'initiation de la traduction a lieu au niveau des séquences internes qui recouvrent la région 5' de l'ARN viral. De plus il a été montré que les 50 nucléotides présents avant le codon AUG (codon d'initiation) jouent un rôle essentiel dans ce mécanisme de traduction IRES dépendant (156).

II.2.4 Assemblage et relargage des virions

La polyprotéine Gag est l'élément essentiel pour la formation de la particule virale. Cette protéine assure l'assemblage par l'intermédiaire des interactions entre protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide. Brièvement, Gag, via son domaine NC, interagit spécifiquement avec différentes séquences nucléotidiques localisées dans l'UTR 5' (90,93,96). Par son activité de chaperonne d'acide nucléique (activité détaillée dans le chapitre activité chaperonne des acides nucléiques, page 45), Gag assure la dimérisation de cet ARN viral de façon concomitante avec son encapsidation dans la particule virale (40,157). Cette interaction Gag-ARN va aussi servir de support sur lequel la protéine Gag se multimérise via des interactions CA-CA (38). Ainsi que des études récentes à montrer par des techniques de fluorescence que le domaine NCp7 de Gag joue un rôle important dans la multimérisation de Gag autour de l'ARN viral car un défaut de multimérisation est observé après délétion du NCp7 (158). Par ailleurs, cette multimérisation semble inhiber la traduction de l'ARN viral et favoriserait ainsi son encapsidation dans la particule virale (23). Enfin, l'acheminement du complexe Gag-ARNv vers les rafts ou les endosomes tardifs sera assuré par la matrice de Gag qui, suite à son groupement myristate en N-ter associé à des résidus basiques permet l'ancrage de Gag dans les lipides membranaires de la cellule (159-162).

La formation d'une particule virale infectieuse s'accompagne aussi du recrutement des protéines virales Vif, Vpr, Nef, Gag-Pol (163,164,165,166) et Env (167). De même de nombreuses protéines cellulaires ont été trouvées encapsidées dans des virus du VIH et cela après purification des virus à partir des macrophages et analyse des protéines par chromatographie phase liquide suivie par une spectrométrie de masse. Ces protéines encapsidées appartiennent à différentes familles telles que des protéines du cytosquelette, d'adhésion, apolipoprotéines E, protéines ribosomales, annexine, annexin-binding-protein, etc... (24). Par ailleurs, des protéines cellulaires appartenant à la famille ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) seront recrutées via leurs interactions avec les domaines NCp7 et p6 de Gag (168-171). Ces protéines vont faciliter le bourgeonnement des virus et le détachement de celui-ci de la membrane cellulaire (172).

II.2.5 Maturation de la particule virale

Après bourgeonnement et relargage de la particule virale dans le milieu extracellulaire, les virions doivent subir une étape de maturation durant laquelle ils gagnent leur pouvoir infectieux et seront prêts à envahir d'autres cellules hôtes. La maturation est réalisée suite à l'activité de la protéase virale qui va cliver les protéines Gag et Gag-Pol pour aboutir à la matrice, capsid, NCp7 et p6 à partir du clivage de Gag et le clivage de Gag-Pol donne naissance à la protéase, intégrase et reverse transcriptase. Ce clivage protéolytique de Gag et Gag-Pol est une étape critique de la maturation virale durant lequel le core viral adapte une forme conique qui protège le génome du VIH (173). La maturation est la dernière étape du cycle viral ; elle est indispensable à la production et l'obtention de virus infectieux. Plusieurs études ont montré qu'un virus déficient en protéase est immature, et non infectieux (174-176).

III. Les partenaires cellulaires de la polyprotéine Gag du VIH-1

La polyprotéine Gag interagit avec plusieurs partenaires viraux (Vif, Vpr) ou cellulaires par l'intermédiaire de ces différents domaines. De nombreuses études ont tenté d'identifier les différents partenaires de Gag par des techniques de spectrométrie de masse, de double hybride.... (27,177,178). Dans ce chapitre j'ai choisi de présenter uniquement quelques cibles cellulaires interagissant plus spécifiquement avec la NC et dont la fonction est connue.

- **ABCE1 (cellular ATP-binding protein)** également appelé inhibiteur de RNase L (RLI1) ou HP68, est un membre de la famille de protéines liant l'ATP. Cette protéine a un rôle anti-apoptotique et pro-tumoral (179,180). Le gène ABCE1 est hautement conservé, sauf chez les bactéries. Il code pour deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) entourant deux sites de liaison de l'ATP. Ils sont reliés par un domaine charnière souple favorisant une proximité spatiale des deux NBDs et facilitant la liaison de l'ATP (181). En outre, l'extrémité N-terminale d'ABCE1 contient une séquence consensus CX4CX3CX3CPXnCX2CX2CX3P formant des clusters fer-soufre (182). Une mutation dans ce domaine affecte la traduction de différentes protéines expliquant l'importance de ABCE1 pour la viabilité des cellules (183). Il a été montré par des expériences de sédimentation (pull-down assay) sur des extraits

cellulaires ainsi que dans un système acellulaire que Gag recrute ABCE1 pour faciliter son assemblage (184). Des mutations au niveau des doigts de zinc de Gag(NC) n'affectent pas l'interaction, tandis que le remplacement de tous les résidus basiques de la NC par l'alanine inhibe l'interaction entre Gag et ABCE1. Ce résultat suggère que les résidus basiques de la NC sont essentiels pour la liaison entre ces deux protéines (185). Cependant, l'addition d'un excès de RNase montre que Gag-ABCE1 est résistant suggérant que cette interaction est indépendante de l'ARN.

- **Stau (Staufen)**, Cette protéine appartient à la famille des protéines liant l'ARN double brins (186,187). Elle joue un rôle dans la localisation, traduction et dégradation de l'ARNm ainsi que dans le transport de complexes ribonucléoprotéines et des granules de stress. Une co-immunoprécipitation a déterminé que Stau interagissait via ces domaines N-ter et dsRBD3 avec la NCp7 de Gag selon une interaction ARN indépendante (188). Par ailleurs, Stau est incorporée dans les virions du VIH-1. Cette interaction aurait comme rôle une régulation de l'oligomérisation de Gag lors de l'assemblage et peut être une meilleur sélection et encapsidation de l'ARN génomique viral (188).
- **Lytic (Lysine-rich carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule coisolated)**. Cette protéine est impliquée dans la neuropathie et dans les voies de signalisations cellulaires y compris la voie Ras, NF- κ B, PI3K/Akt et Wnt/ β -catenin (189). De plus cette protéine possède un effet anti-apoptotique impliqué dans la tumorigenèse. Suite à une série d'expérience combinant la sédimentation (pull-down) et la spectrométrie de masse, Lyric a été identifiée en tant que partenaire de Gag. Cette interaction est indépendante de l'association de Gag à la membrane cellulaire. Ce complexe protéique nécessite les domaines matrice et NCp7 de Gag et le domaine 101-129 de Lyric. Enfin, il a été montré que la liaison entre Lyric et Gag est dépendante de la multimérisation de Gag. De plus un mutant de délétion du domaine de liaison de lyric à Gag induit une diminution de l'infectivité virale en comparaison au virus formé en présence de Lyric sauvage, ce qui souligne le rôle de l'interaction Gag-Lyric dans la régulation de l'infectivité virale (189)

- **Actine**, composant essentiel du cytosquelette, c'est une protéine présente dans la cellule humaine sous forme de microfilaments assurant le déplacement des organites dans la cellule. L'actine interagit avec la NC de Gag du VIH-1 de plus elle s'est trouvée incorporée dans les virions ce qui suggère son rôle dans l'assemblage viral et/ou dans d'autres étapes du cycle viral du VIH-1. (190)
- **ALIX (Apoptosis Linked gene 2 Interacting protein X)**, protéine impliquée dans les événements de fissions membranaires et dans divers processus intracellulaire (apoptose, endocytose). ALIX interagit avec le domaine NC de Gag du VIH-1 via ces domaines Bro1 et LYPx_nL d'une manière dépendante de l'ARN (171,191). D'une manière intéressante, une étude de cette interaction a prouvé que les résidus basiques de la NCp7 de Gag sont responsables de la liaison entre Gag et ALIX (192). Enfin, l'interaction entre Gag et ALIX permet à cette dernière de recruter les protéines de la famille ESCRT-III via son domaine Bro1, ce qui induit une séparation des membranes virales et cellulaires lors du relargage des particules virales dans le milieu extracellulaire (191).
- **la Nuc (Nucleoline)**, cette protéine interagit avec les ARN, et assure leur transport du noyau vers le cytoplasme et joue un rôle dans la biogenèse des ribosomes (193). Il a été montré par des tests doubles hybrides et sédimentation que la Nuc interagit avec la NCp10 de Gag du virus MuLv (194) et que cette interaction pourrait être stabilisée grâce au domaine de la capsid de Gag. De plus, une surexpression de la Nuc induit une inhibition du pouvoir infectieux des virus et de la libération des virions ce qui souligne son rôle dans l'assemblage viral. Cependant, cette interaction n'a jamais été décrite pour la NCp7 d'HIV.
- **RPS19** est une protéine ribosomique qui a été montré interagir avec la protéine Gag du hantavirus (195). Cette interaction facilite le recrutement du ribosome à la coiffe lors de l'initiation de la traduction médiée par la protéine N de Gag chez hantavirus, similaire à la NCp7 chez VIH-1. Par ailleurs, la RPL9, protéine de la grande sous-unité ribosomale, interagit avec Gag du MMTV et cette interaction favorise l'assemblage, le bourgeonnement et la production virale (196)

IV. Les protéines ribosomales

Le ribosome (80S chez les eucaryotes et 70S chez les procaryotes) est l'organe responsable de la traduction des ARN en protéine. Chez les eucaryotes, il est formé de deux sous unités, la petite sous unité (40S) et la grande sous-unité (60S) (197). La sous unité 40S lie l'ARN 18S et la grosse sous unité possède trois ARN ribosomal (5S, 5.8S et 28S). Ensuite les ARN des deux sous-unités ribosomales seront associés à 80 protéines ribosomales et 150 protéines non ribosomales (198). Durant le processus de traduction, le ribosome fixe simultanément l'ARNm et l'ARNt pour former les protéines en fonction de la séquence nucléotidique de cet ARNm, chaque codon de la séquence de l'ARNm (3 bases) correspond à un a.a porter par l'ARNt.

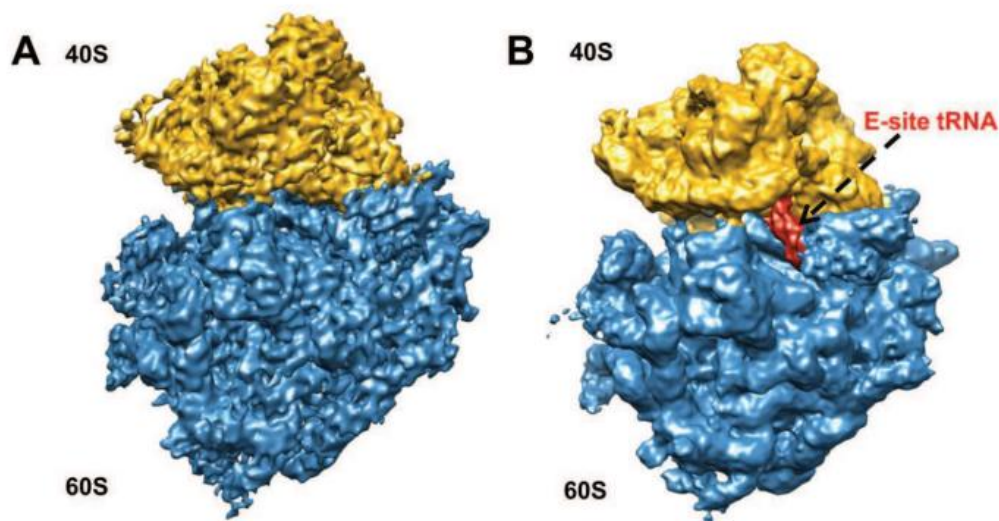


Figure 16 : (A) La structure du ribosome humain 80S seul ou (B) avec un ARNt dans le site E. la couleur jaune représente la petite sous-unité ribosomale (40S), le bleu représente la grande sous-unité (60S) et l'ARNt est représenté en rouge

Le ribosome possède trois sites, notés A, P et E.

- Le site A (acide aminé), situé sur la petite sous-unité ribosomique, est celui sur lequel l'ARNt correspondant au codon d'ARNm en cours de lecture vient se lier au complexe ribosome-ARNm.
- Le site P (peptide), situé sur la grande sous-unité ribosomique, est celui sur lequel se fixe la chaîne polypeptidique naissante, liée à l'ARNt correspondant au codon précédant celui en cours de lecture.
- Le site E (exit) est celui sur lequel vient se fixer l'ARNt débarrassé de la chaîne polypeptidique naissante lorsque celle-ci est transférée depuis le site P vers l'ARNt du site A (199). Dans ce cadre, plusieurs études ont été réalisées pour expliquer la spécificité de fixation de l'ARNt portant l'a.a correspondant au codon de l'ARNm parmi tous les ARNt présents dans la cellule. Ainsi, une étude utilisant le footprinting, cross-linking et la mutagenèse a montré que l'ARNr de la petite sous-unité est impliqué dans la sélection de l'ARNt correspondant. De plus cette étude montre que l'ARNt portant l'a.a correspondant à l'ARNm possède une affinité supérieure aux autres ARNt présent dans le cytoplasme de la cellule. Dans un second temps, une étude de cristallographie a montré que la liaison de l'ARNt sur le site A du ribosome induit un changement conformationnel au niveau du site de fixation ce qui induit une stabilisation de cet ARNt sur le ribosome (199).

Après avoir fixé l'ARNt correspondant au ribosome la biosynthèse protéique commence généralement au niveau d'un codon AUG correspondant à la méthionine. Ensuite le ribosome parcourt l'ARNm codon par codon, en ajoutant chaque fois l'acide aminé correspondant au codon de l'ARNm. Ce processus nécessite de l'énergie qui sera fourni par l'hydrolyse d'une molécule de GTP à chaque changement de codon, ainsi qu'il sera facilité par des facteurs d'élongations comme l'eEF-1 α chez les eucaryotes et son analogue EF-Tu chez les procaryotes. La fin de la traduction sera marquée lorsque le ribosome atteint un des trois codons de terminaison de l'ARNm (UAA, UGA ou UAG) et le facteur RF (release factor) au niveau du site A. A ce moment le ribosome se détache de l'ARNm et la protéine naissante se libère dans la cellule ou au niveau d'un organite spécifique assurant sa modification post traductionnelle.

Des études récentes montrent que les protéines ribosomales possèderaient d'autres rôles que leur fonction dans la structure et l'assemblage du ribosome. Elles interviendraient dans la régulation de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN (200). Je vais ici citer quelques exemples :

- Le contrôle du cycle cellulaire repose sur la voie MDM2/p53. Dans les conditions normales le taux de p53 est maintenu bas suite à l'ubiquitination de la p53 par la MDM2 qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Suite au stress cellulaire des protéines ribosomales seront surexprimées et conduit à l'accumulation de grande quantité de p53 induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou apoptose. Dans ce cadre je cite trois catégories de protéines ribosomales :
 - 1- Les protéines interagissant avec la MDM2 et inhibant son interaction avec la p53, comme la L5 et L11.
 - 2- Les protéines qui favorisent l'interaction entre la MDM2 et L5 ou L11 sans interagir avec la MDM2, cette catégorie groupe la L24, L29, L31, L37, L7A, S6, S9, S19, et S23
 - 3- Les protéines qui interagissent avec la MDM2 et la MDM2 E3 ligase et ne permet pas la dégradation de la p53. La L26, S7, S27a et S27L font parties de cette catégorie.

De plus, d'autres protéines ribosomales ont été identifiées, ces dernières induisent une surexpression de la p53 en agissant sur l'ARN messager de p53 (ARNm) comme la RPL26 qui lie le 5'-UTR de l'ARNm de p53 et active sa traduction (Figure 17).

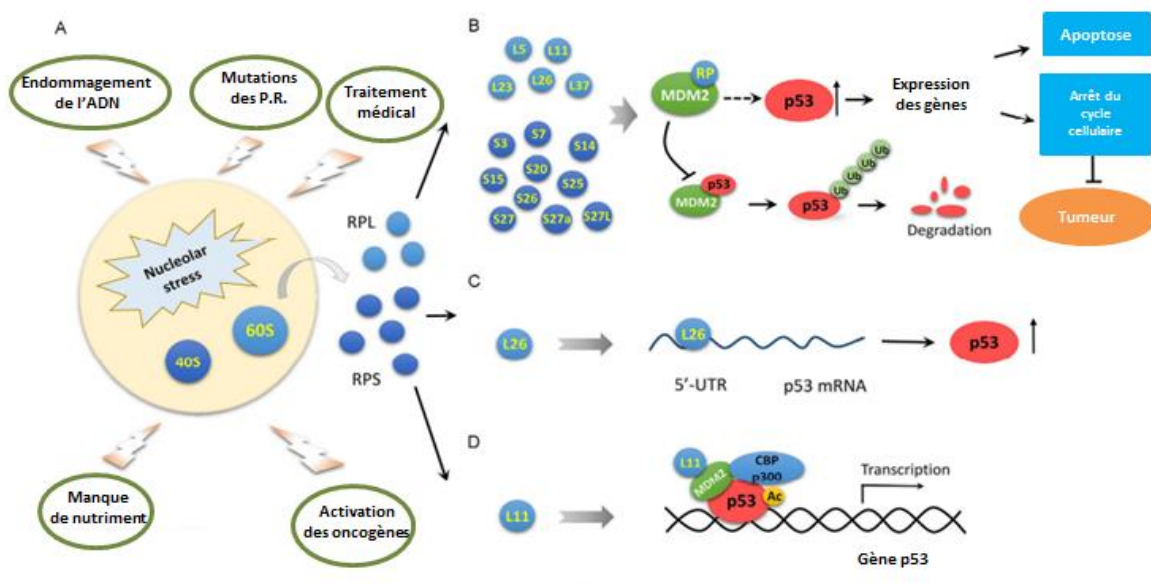


Figure 17 : Schéma montrant les rôles des protéines ribosomales (adapté de (200))

- D'autre part, les protéines ribosomales interagissent avec des facteurs de transcription telle que c-Myc, SP1 et NMP. Cette interaction augmente l'expression des protéines cellulaires (200).
- Les protéines ribosomales jouent un rôle de détecteur d'endommagement de l'ADN et participe directement à la réparation de l'ADN génomique causé par le stress cellulaire, par des radicaux libres, rayons UV, stress oxydative, etc. Ces protéines participent donc au maintien de la stabilité génomique et cela en augmentant le niveau d'expression de la p53 cellulaire par les mécanismes cité ci-dessus.

IV.1 La RPL7 humaine (Ribosomal Protein L7)

IV.1.1 Structure

Cette protéine de la grande sous-unité ribosomale possède 248 acides aminés (a.a) (<https://www.nextprot.org/proteins/search?query=RPL7>). Le domaine central de la protéine est ancré dans le ribosome. Il est impliqué dans la structuration du ribosome et dans les interactions protéine-protéine. Le domaine C-ter de la RPL7, très conservé, est localisé sur la face interne du ribosome Cette région permettrait l'ancrage du ribosome dans le réticulum endoplasmique (RE). Enfin, la partie N-terminale, hydrophile et basique est exposée à la surface du ribosome (201). Ce domaine N-ter adopte une conformation en hélice α (entre la proline 27 et la proline 106). De plus, des anticorps anti-Nterminal de la RPL7 ont été

développé et ont servi comme outils de suivis du ribosome dans les cellules eucaryotes par des expériences d'immunofluorescence.

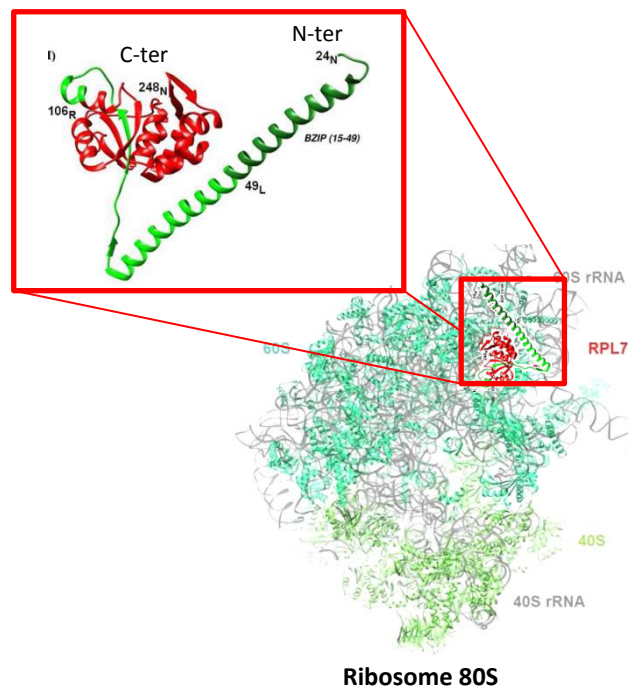


Figure 18 : structure tridimensionnelle de la protéine RPL7 et dans le ribosome 80S de *Drosophila melanogaster*. La grande sous unité 60S représenté en bleu claire, la petite sous unité en vert et l'ARNr en gris. Le domaine C-ter de la RPL7 représenté en rouge, le domaine central en vert clair et le domaine N-ter exposé au solvant en vert foncé.

Une autre étude structurale a montré que la région N-ter est une région de type "Leucine zipper" (BZIP) responsable de la dimérisation de la RPL7 (202). Par ailleurs, la RPL7 possède deux domaines NBD1 et NBD2 riches en résidus basiques localisés dans les parties N et C terminales respectivement. Ces domaines sont responsables de l'interaction de la protéine avec les ARN, notamment l'ARN ribosomal 28S et l'ARNm de la RPL7, et ce avec une affinité nanomolaire (203). De plus, par des expériences de compétition, il semble que la RPL7 possède une préférence pour les ARN viraux ainsi que pour les ARN riches en A et G comparée à celle des ARN riches en U et C (203).

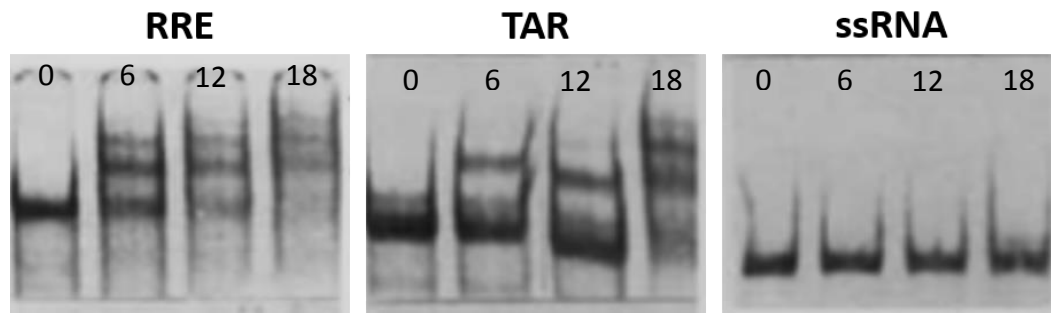


Figure 19 : gel retard entre 10nM de la séquence RRE, TAR et ARN simple brin (ssRNA) et des concentrations croissantes de la RPL7 humaine allant de 0nM jusqu'à 18nM (203).

Enfin, la RPL7 possède trois NLS (*Nuclear Localisation signal*) dans sa région N-ter et un NLS dans son domaine central formé de 144 a.a en position 156-167. Ces NLS sont responsables de sa localisation nucléaire.

IV.1.2 Localisation cellulaire

La seule étude de la localisation de la RPL7 a été effectuée par le groupe de Lin.A en 2006. Dans cette étude, les auteurs ont suivi l'expression et la localisation de la RPL7 décorée d'un Flag à son extrémité N-ter. Les résultats montrent une localisation dans différents compartiments cellulaires et cette distribution varie en fonction du temps. Il s'agit de quatre distributions essentielles (a) localisation cytosolique, (b) condensée à la membrane nucléaire, (c) nucléoplasme vésicules intranucléaire et (d) nucléolaire (Figure 20, A).

A noter que la RPL7 a été détectée dans le cytoplasme 4 h post-transfection et cette distribution cytoplasmique diminue en fonction du temps (6h, 12h et 24h) pour enrichir les autres localisations déjà citées (Figure 20, B).

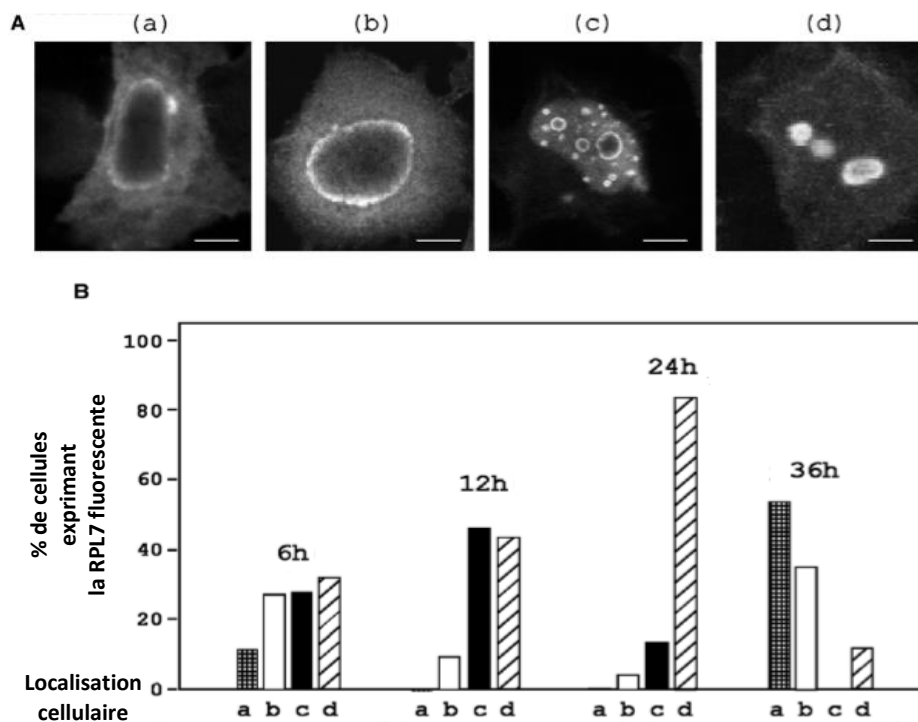


Figure 20 : Analyse de la localisation cellulaire de Flag-RPL7. A) Détection de Flag-RPL7 dans différents compartiments à différents temps. Ces images sont obtenues par microscopie confocale après marquage immunologique par un anticorps primaire anti-Flag et un anti corps secondaire couplé au FITC. Echelle représente 5µm. B) Distribution cellulaire de la Flag-RPL7 observés à différents intervalles de temps post-transfection.

IV.1.3 Fonctions

La RPL7 des cellules eucaryotes joue un rôle dans l'assemblage du ribosome ainsi que d'autres rôles extra-ribosomiaux:

- 1- La liaison au RE : Le domaine C-ter de la RPL7 situé à la face interne du ribosome est capable de lier le RE. Ce résultat suggère que la partie C terminale puisse permettre l'ancrage du ribosome au RE. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par la technique de SPR (*Surface Plasma Resonance*) en comparant la RPL7 et un mutant de la L7 délété des 50 a.a en C-ter ($\Delta C50$) avec lequel l'interaction RE-ribosome est perdue (201). Ces études ont permis de proposer un modèle selon lequel la RPL7 sera responsable de l'ancrage du ribosome à la membrane du RE.
- 2- Inhibition de la traduction : l'équipe de Neumann F. a exploré l'effet de la RPL7 sur la traduction. Pour cela, les auteurs suivent la traduction de deux ARNm codant pour la luciférase et pour la RPL7. Les résultats ont montré une diminution de l'expression des deux protéines suite à l'addition de la RPL7. Cette diminution est dépendante du

temps d'incubation de l'ARNm avec la RPL7. De plus, l'ajout d'un anticorps anti-BZIP, anticorps qui reconnaît l'extrémité N-ter de la RPL7, a permis de neutraliser la capacité de la RPL7 à inhiber la traduction. Ce résultat suggère que l'inhibition de la traduction par la RPL7 est médiée par son domaine BZIP ainsi que la RPL7 a besoin de se dimériser pour interagir avec les ARN et inhiber la traduction (202) (Figure 21).

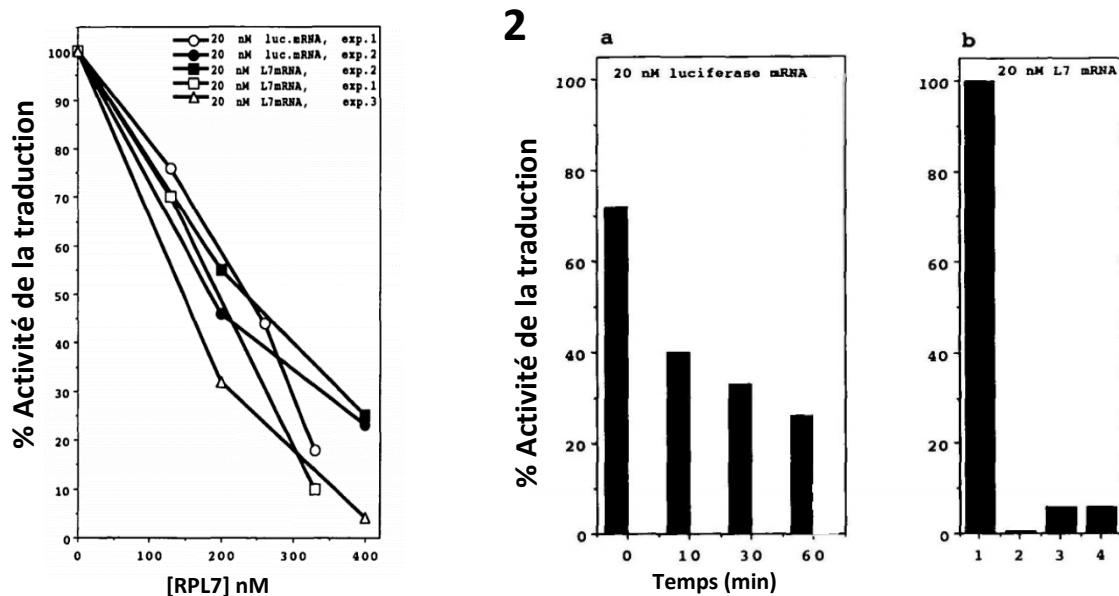


Figure 21 : 1) courbes montrant l'effet dose de l'inhibition médiée par la RPL7 dans un système de traduction acellulaire : inhibition de l'ARNm de la RPL7 et de l'ARNm de la luciférase après ajout de la RPL7. 2) cinétique de l'inhibition de la traduction des ARNm de la luciférase et RPL7 en fonction du temps (202)

V. Activité chaperonne :

L'activité chaperonne est la capacité d'une protéine à assister son partenaire dans un processus de repliement moléculaire afin d'aboutir rapidement à une forme active et thermodynamiquement stable. Il existe deux grandes familles de chaperonne, les protéines chaperonne de protéines et les protéines chaperonne d'acides nucléiques. Ma thèse ayant porté essentiellement sur cette deuxième catégorie, seule une brève présentation des chaperonnes de protéine sera présentée.

V.1. Activité chaperonne des protéines :

Au cours de la synthèse protéique, les peptides naissants ont tendance à adopter des structures non fonctionnelles ou à s'agréger suite à des liaisons inter-ou intra-brin. Cela peut mener à des protéines inactives induisant plusieurs perturbations du cycle cellulaire (204). La nécessité d'obtenir des protéines actives requiert des protéines accessoires dont l'activité chaperonne permet aux protéines naissantes d'adopter rapidement une structure tridimensionnelle active et d'éviter leur agrégation (205). Les protéines chaperonnes de protéines ont notamment montré leur importance dans le cadre du stress cellulaire qui peut aboutir à la dénaturation des protéines, ainsi que lors de la translocation des protéines (204-206)

De nombreuses protéines chaperonne ont été étudiées et décrites. Parmi celles-ci, les HSP (*Heat Shock Protein*) sont les plus connues. L'expression de ces protéines augmente en cas de stress cellulaire, on peut citer par exemple Hsp60 (GroEL/GroES complex chez *E. coli*), Hsp70 (DnaK chez *E. coli*), Hsp90 (HtpG chez *E. coli*) ou encore Hsp100 (Clp family chez *E. coli*).

V.2. Activité chaperonne des acides nucléiques (AN):

V.2.1 Principe de l'activité chaperonne des AN

La structuration des molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) est également une étape clef permettant l'obtention de molécules actives et fonctionnelles. Tout comme les protéines, les AN sont capables d'adopter une multitude de conformations inactives. Ces défauts de repliements peuvent être éliminés ou réduits grâce à l'activité de protéines chaperonnes (207,208). Ces protéines chaperonnes interagissent avec l'acide nucléique, stabilisent sa structure fonctionnelle ou déstabilisent les formes non fonctionnelles afin d'aider ce dernier à saisir une structure active (209). Cette fonction de chaperonne est indispensable pour faciliter les interactions ARN-ARN, ARN-ADN ou ADN-ADN.

Il ne suffit pas à une protéine d'être capable de se lier aux AN pour être considérée comme chaperonne. En effet, il existe deux catégories de protéines affines pour les AN. La première contient les protéines qui fixent l'AN d'une manière spécifique et stabilise sa structure alors que la deuxième catégorie regroupe les protéines chaperonnes qui fixent non

spécifiquement l'acide nucléique et aide à sa structuration. Les protéines chaperonnes d'AN jouent différents rôles dans divers processus métaboliques comme : régulation de la traduction (la protéine hfq chez *E.coli* qui facilite l'interaction entre ARN-ARNm et inhibe l'expression de la protéine (210)), réplication virale (NCp7 et Gag d'HIV, Core d'HBV, core d'HCV...), etc... Les protéines chaperonnes ont en commun l'absence de séquence primaire consensus et d'être très peu structurées rendant difficile de prédire une propriété de chaperonne des AN. La plupart des protéines chaperonnes d'AN présentent de larges domaines non structurés (211,212).

Ces domaines sont impliqués dans des phénomènes de transfert d'entropie entre la protéine et son substrat lors de la liaison avec les acides nucléiques. Ce processus de transfert d'entropie constituerait un des mécanismes permettant aux chaperonnes de réarranger les acides nucléiques (212). D'un point de vue mécanistique, la protéine chaperonne fixe d'une façon peu spécifique l'AN. Cette interaction peut entraîner dans certains cas, la structuration du domaine de la protéine chaperonne impliqué dans le complexe (Figure 22, 1, domaine vert). Par exemple, la NCp7 du VIH-1 lie l'AN par ces deux doigts de zinc et, suite à cette liaison, la distance entre ces deux motifs dactyles décroît (213). Ensuite, un autre domaine peu structuré de la protéine entre en contact avec un domaine déstructuré du substrat induisant une structuration du domaine de la chaperonne et une déstructuration de l'AN (Figure 22, 2, domaine vert). Cela a comme conséquence une augmentation de la flexibilité du substrat et un rapprochement entre les domaines de la protéine chaperonne et l'AN. Cette proximité induit une interaction des domaines structurés de la chaperonne et des domaines mal-repliés de l'AN menant à un autre processus de transfert d'entropie entre les partenaires. À la fin de ce phénomène, la protéine chaperonne se trouve non-structurée et détachée de l'AN replié et actif. Finalement la chaperonne sera prête à fixer un autre substrat mal replié ou en cours d'agrégation.

Il faut par ailleurs souligner que la protéine chaperonne peut lier et relâcher son substrat plusieurs fois au cours du processus de repliement jusqu'à ce que ce dernier adapte une structure active et thermodynamiquement stable (212).

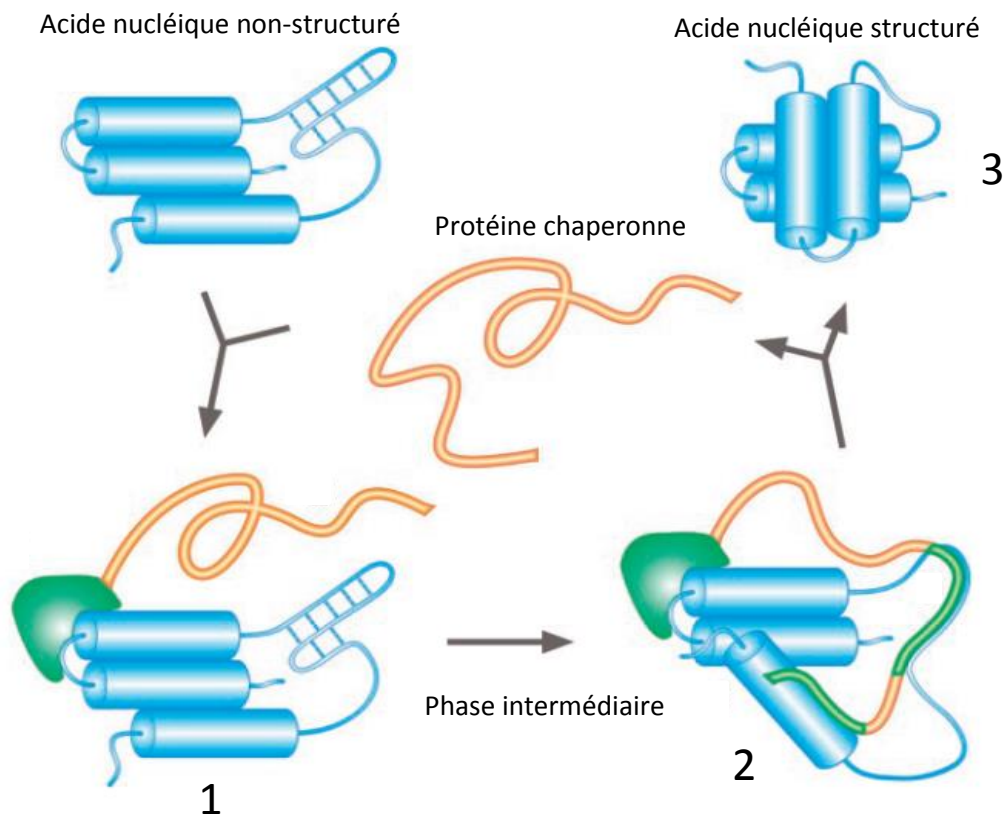


Figure 22: Modèle de transfert d'énergie expliquant les différentes étapes de structuration de l'AN par une protéine chaperonne (adapté de (212))

V.2.2 tests de l'activité chaperonne

Les protéines chaperonnes d'acides nucléiques sont définies comme des protéines dont le rôle est de permettre à l'ADN et ARN de se réarranger pour atteindre la conformation thermodynamique la plus stable et potentiellement la plus active. Cette activité repose sur trois propriétés :

- i) Une capacité à se lier à différentes structures d'AN d'une manière peu spécifique afin de résoudre le maximum d'états désordonnés
- ii) Une capacité à déstabiliser les structures des AN afin de les replier d'une manière optimale
- iii) Une capacité à favoriser l'hybridation de séquences parfaitement complémentaires afin de permettre un ré-appariement optimal et de générer les conformations thermodynamiquement stables.

Pour considérer une protéine comme chaperonne des AN, cette dernière doit posséder deux des trois propriétés citées ci-dessus. Dans ce cadre, plusieurs tests ont été

développés pour tester l'activité chaperonne des protéines vis-à-vis les acides nucléiques. Cependant, comme ces tests présentent quelques limitations, il est nécessaire d'en combiner plusieurs pour vérifier si la protéine cible est effectivement douée d'activité chaperonne (209,211,212). Dans les deux paragraphes ci-dessous, certains tests utilisés *in vitro* et *in cellulo* seront décrits.

Tests in vitro

Les tests *in vitro* utilisent des systèmes d'acides nucléiques (ADN ou ARN) ou des ribozymes. Dans ces tests, la protéine chaperonne doit pouvoir être dissociée de l'AN après avoir effectué son activité, ce qui souligne la différence entre les protéines chaperonnes et les protéines qui fixent l'AN et stabilisent sa structure en restant liée à ce dernier. Les techniques de biophysique comme le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), FCS (*Fluorescence correlation spectroscopy*), SMS (*single-molecule spectroscopy*) et SPR (*surface plasmon resonance*) sont en général utilisées pour explorer le mécanisme par lequel la protéine chaperonne l'acide nucléique.

Ces différents tests sont classés selon leur complexité en deux groupes :

- Les tests simples qui se focalisent sur un seul aspect de la propriété chaperonne (hybridation, déstabilisation ou transfert de brin)
- les tests complexes dans lesquels plusieurs propriétés sont testées en même temps (ribozyme ou clivage des introns etc...) (209,214,215).

L'activité de déstabilisation-hybridation des AN : la déstabilisation consiste à dissocier la structure double brin de l'AN (dés-appariement des contacts Watson-Crick des tiges) donnant lieu à un déroulement de sa structure. Cette déstabilisation dépend donc de l'énergie d'appariement, elle-même fonction des paires AT ou CG, des mis-appariements, du fait que c'est un ADN ou un ARN.... Cette déstabilisation est suivie par un ré-appariement sur le nouveau brin d'AN utilisé dans le test. Si la protéine possède un pouvoir chaperonne des AN, cette réaction sera effectuée en quelques minutes alors qu'elle pourrait nécessiter plusieurs heures ou jours sans protéine.

Dans le cas d'un test *in vitro* développé par notre équipe, ce test consiste à suivre l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires ayant une structure en tige-boucle. Ces deux brins d'ADN correspondent à la version desoxyribonucléotidique de la séquence TAR (dTAR) du génome du VIH-1 et à son complémentaire (cTAR). Ces séquences ont été choisies pour mimer le premier saut inter-brins lors de la transcription inverse (216). Dans ce test, cTAR (appelé ci-dessous cTAR Beacon) possède en 5' un dabcyI et en 3' une rhodamine. Leur proximité due à la structure en tige-boucle de cTAR donne lieu à un FRET important entre les chromophores et en conséquence à une faible intensité. Lors de l'hybridation de cTAR avec dTAR, les deux chromophores se retrouvent éloignés, le FRET diminue et l'intensité de fluorescence de la rhodamine augmente (Figure 23). Cette hybridation nécessite plus de 24 heures en absence d'une protéine chaperonne telle que la NCp7 du VIH-1 tandis qu'en présence de cette protéine, cette réaction s'effectue en trente minutes. De plus, l'utilisation de plusieurs mutants (mutants des tiges ou des boucles) des AN aident à déchiffrer la voie d'hybridation de ces deux brins complémentaires en présence de la protéine cible (la voie d'hybridation change par rapport à la protéine) (217-220).

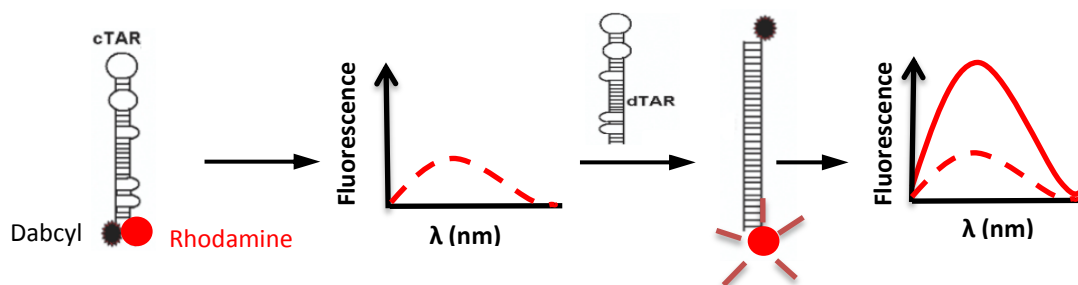


Figure 23 : Schéma montrant le principe du test d'hybridation de cTAR-dTAR

Un autre système basé sur la dimérisation de deux brins d'ARN viral simple brin a été développé. Dans ce test, les ARN sont radioactifs et la formation du dimère sera suivi sur gel d'agarose (221, 222, 223). De plus, une autre équipe a développé un test *in vitro* pour tester l'activité chaperonne des protéines et cela en hybridant un tRNA sur un ARN spécial du VIH-1 (PBS) et la formation du complexe d'ARN est monitorer sur gel en condition radioactive (102).

D'autres tests plus complexes ont été mis au point pour vérifier la présence d'activité chaperonne des acides nucléiques. Dans ces tests plusieurs propriétés sont étudiées en même temps (clivage des introns, activité des ribozymes, etc ...). Par exemple, un ARN immature contenant des exons et introns est utilisé et deux réactions d'hydrolyse sont activées selon la température et le cofacteur ajouté. Pour stimuler une hydrolyse Cis ou Trans un ajout de la guanosine exogène est nécessaire. Mais dans ces deux types de coupure, la température joue un rôle de stimulateur ; par exemple une température de 37°C stimule la coupure en Cis et une basse température stimule celle en Trans (224,225). La présence d'une protéine chaperonne des AN facilite la structuration de l'ARN après clivage et la liaison des deux exons après élimination de l'intron (Figure 24, d, e). Enfin, la protéine chaperonne se trouve détacher de son substrat à la fin de réaction. Une deuxième approche peut être utilisée dans laquelle le substrat du ribozyme est ajouté au ribozyme en présence et absence de protéine chaperonne. La réaction de coupure du substrat par le ribozyme sera suivie sur gel ; cette réaction est améliorée en présence de la protéine chaperonne.

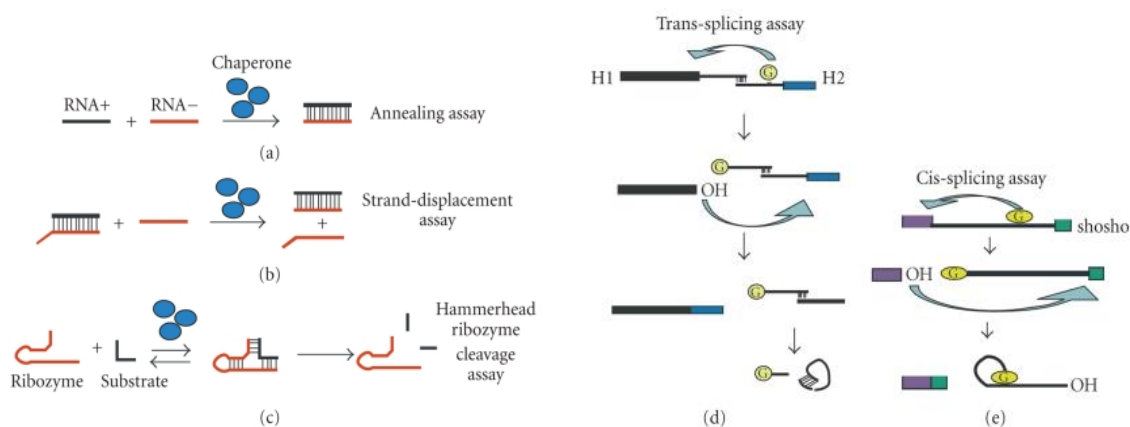


Figure 24: Schéma montrant les différents tests *in vitro* utilisés pour investir l'activité chaperonne des acides nucléiques d'une protéine cible. Les figures a, b, c résument les tests simples et d, e les tests complexes. a) hybridation des deux brins d'ADN ou d'ARN en présence de la chaperonne, b) changement de brin, une déstabilisation de la structure initiale à lieu suivie d'une hybridation d'un nouveau brin d'acide nucléique. c) l'hydrolyse par le ribozyme est augmentée en présence de la protéine chaperonne. d) la coupure en trans de l'intron situé entre les deux exons H1 et H2. e) une hydrolyse en Cis à lieu à 37°C en présence de la chaperonne (Adapté de Katharina Semrad, 2011 (225)).

Tests in cellulo

Des essais *in cellulo* ont été développés dans le but d'étudier les protéines chaperonnes dans leur contexte biologique. Un des premiers tests développés s'appelle le "folding trap assay" (Figure 25, a-c) qui consiste à suivre des ARN dont la structure complexe rend inaccessible l'intron au mécanisme d'épissage. Cet ARN est exprimé dans des *E.Coli* et son épissage suivi en exprimant la protéine chaperonne d'intérêt (comme la protéine thymidylate synthase, tdSH1, provenant du phage T4, facilite l'épissage de l'ARN lorsqu'elle est surexprimée dans *E.coli* (226)). Ce système est très performant pour tester l'activité chaperonne des protéines *in cellulo* mais il peut être limité par le fait que la surexpression de l'ARN ou de la protéine cible puissent être toxiques pour la bactérie.

Le deuxième test est connu sous le nom de "transcriptional assay". Dans ce test, un gène de résistance au chloramphénicol (Chloramphénicol acétyl transférase, CAT) est placé en aval d'un fragment d'ARN adoptant une structure en tige boucle (Figure 25, d, e). Cette structure empêche l'expression du gène de résistance et la bactérie devient sensible au chloramphénicol. En surexprimant la protéine d'intérêt, celle-ci par son activité de chaperonne déstabilisera la structure en tige boucle, permettra l'expression de la CAT et en conséquence rendra la bactérie résistante au chloramphénicol. D'autres essais sont utilisés en milieu cellulaire comme l'épissage des introns du groupe 1 par la protéine CYT-19, l'activité des deltas ribozymes et la reverse transcription en utilisant un vecteur rétroviral du virus MLV (227).

En conclusion l'analyse de l'activité chaperonne en milieu cellulaire a permis l'étude de plusieurs protéines. Cependant, ces expériences présentent quelques difficultés telles que la toxicité des ARN ou des protéines transfectées. Par exemple, les protéines chaperonnes étant peu spécifiques, leur surexpression peut facilement perturber le métabolisme bactérien (225).

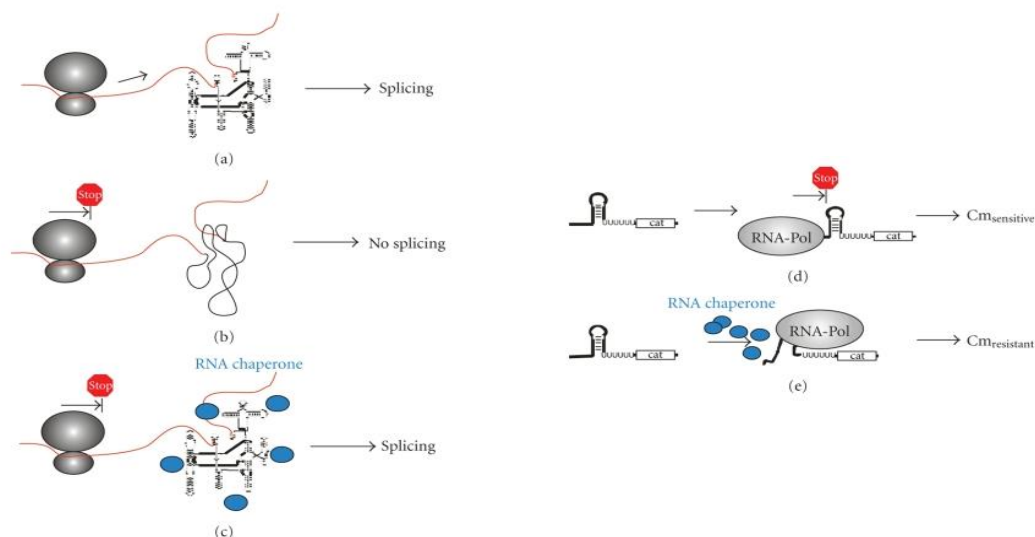


Figure 25: Schéma montrant les différents tests *in cellulo* utilisés pour investir l'activité chaperonne des acides nucléiques d'une protéine cible. a, b, c résumes le "folding trap assay" et d, e "transcriptional assay". a) en présence de la transcription l'ARN est structuré, b) en absence de transcription cet ARN sera déstructuré et c) en présence de la protéine chaperonne qui va structurer l'ARN et le clivage aura lieu. d) suite à la structure de l'ARN la transcription du gène de résistance au chloramphénicol n'aura pas lieu, e) en présence de la protéine chaperonne la structure en tige-boucle sera déstabiliser et le gène de résistance sera exprimer et la bactérie sera résistante au chloramphénicol.

V.2.3 Exemples de protéines chaperonnes des acides nucléiques : la NCp7, Gag du VIH-1 et les protéines ribosomales

Plusieurs protéines possèdent une activité chaperonne des acides nucléiques et assistent au repliement de leurs partenaires, parmi ces protéines on trouve des protéines humaines, virales et bactériennes. On développera ci-dessous quelques exemples des protéines chaperonnes.

NCp7 du VIH-1

La NCp7 est une protéine de 55 acides aminés qui est le produit de maturation par la protéase virale de la polyprotéine Gag du VIH-1 (68). L'ensemble des travaux structuraux déjà cités (page 16) ont permis de guider de très nombreux travaux portant sur les différents rôles de la NCp7. Qui se résume en : rôle dans les étapes initiales (transcription inverse et l'intégration de l'ADN dans le génome de la cellule hôte) et finales du cycle viral (formation du dimère d'ARN et l'hybridation du tRNA sur le PBS). Tous ces rôles ont en commun la réorganisation des acides nucléiques et ont permis d'attribuer une propriété de chaperonne des AN à la NCp7 (219,228-234). Pour cela ce peptide à fait l'objet de nombreuses études qui

ont montré que la NCp7 hybridait le tRNA sur le PBS, dimérisait l'ARN génomique et les sauts inter-brins lors de la reverse transcription (90,102,157,233,235-240).

Plus récemment, des études au niveau moléculaire ont permis de mieux décrire les mécanismes et ont montré que les doigts de zinc de la NCp7 étaient responsables de son activité de déstabilisation des AN (Figure 26) (50,230,241).

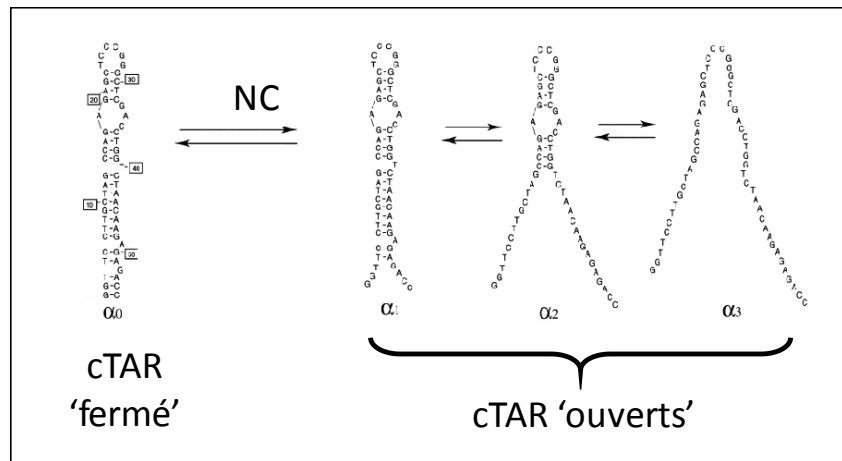


Figure 26: schéma montrant la déstabilisation de cTAR (AN en tige-boucle) par la NCp7.

Cette déstabilisation se traduit de différentes manières allant de la diminution de stabilité des séquences double brin, à une modification de la structure tertiaire ou encore une modification conformationnelle de la structure en tige boucle comme dans le cas de (+)/(-) PBS et cTAR/dTAR. Ainsi que la NCp7 est capable d'hybrider des séquences d'acides nucléiques complémentaires de même nature (ADN/ADN ou ARN/ARN) ou de nature différentes (ADN/ARN) (233,239,242) ce qui permet le passage de la structure initiale (tige-boucle) vers la structure finale (complexe étendu). Cette réaction se fait selon un mécanisme en deux étapes (Figure 27). En fonction des substrats, une hybridation tige-tige et/ou boucle-boucle des brins complémentaires permet la génération rapide d'un complexe intermédiaire qui est suivi de manière plus lente vers la formation d'un complexe étendu stable (219,233,239).

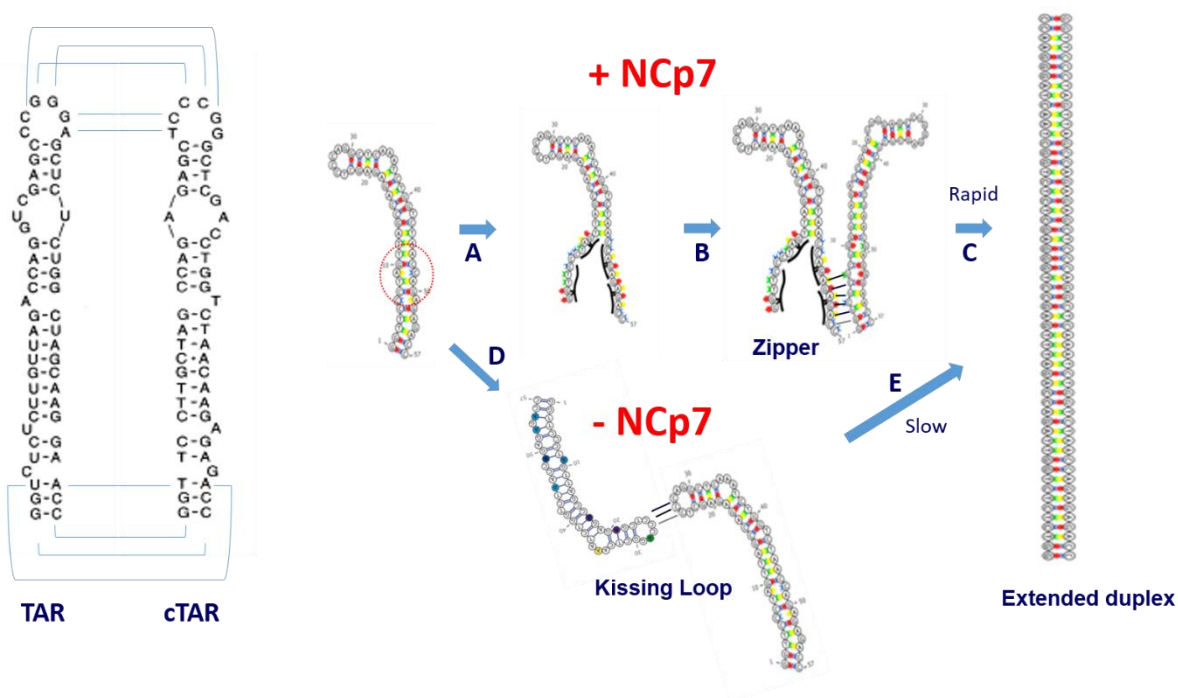


Figure 27: Schéma montrant le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la NCp7.

Par ailleurs, de nombreux mutants de la NCp7 ont été testés. Ainsi, la NCp7 (55 acides aminés) est une chaperonne plus efficace que la NCp7 (11-55), un mutant de la NCp7 délété de la partie N-terminal basique. Cela montre que l'extrémité N-ter de la NCp7 joue un rôle important probablement par sa capacité à agréger plus efficacement les AN (232,234,243).

Enfin, les peptides NCp15 et NCp9 (Figure 8) ont fait l'objet de quelques études cherchant à comparer leurs pouvoir de chaperonne des AN à celui de la NCp7. Ces études montrent que la NCp9 présente un pouvoir chaperonne supérieur à celui de la NCp15 et NCp7. Ces résultats permettent de suggérer que l'activité chaperonne de la NC nécessite les deux doigts de zinc mais aussi le peptide SP2 contenant plusieurs acides aminés basiques et aromatiques (102,244).

Activité chaperonne de la protéine Gag du VIH-1

La protéine Gag est le composant essentiel pour organiser la formation de la particule virale. Le modèle courant stipule que la protéine Gag forme des oligomères de petite taille via des interactions protéine-protéine médiées par la partie C-terminale de CA (23,245). En parallèle, le domaine NC va reconnaître l'ARN génomique, notamment les séquences de la

région Ψ localisée dans l'UTR 5' (30,246). De plus, Gag et la NCp7 libre reconnaissent les mêmes domaines de liaison aux acides nucléiques (TG-, UG-) et les lie avec une affinité similaire. Cependant, l'affinité de Gag aux AN est faiblement dépendante de la concentration saline ce qui sous-entend que l'interaction Gag-AN soit stabilisée par des résidus hydrophobes et aromatiques. (247-249). Cette interaction va avoir comme effet de polymériser la protéine Gag en complexe de 1500 à 3000 protéines autour de l'ARN viral et permettre son encapsidation spécifique (38,250). De façon concomitante, la protéine Gag expose sa partie N terminale myristillée et le complexe nucléoprotéique est ainsi ancré à la membrane plasmique de la cellule (162,251).

La NCp7, au sein de Gag, est certainement le domaine le plus essentiel pour permettre l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique dans les particules virales. De manière intéressante, l'échange de la NCp7 pour la NCp10 de MoMuLV favorise l'encapsidation de l'ARN murin dans les particules d'HIV et inversement (252,253). Par ailleurs, des travaux anciens sur RSV et sur MLV ont montrés que les ARN purifiés à partir des virus étaient dimériques et suggéraient aussi que cette dimérisation avait lieu au moment de l'encapsidation (254,255). Ces résultats ont été confirmés en mutant la protéase et en montrant chez HIV et chez d'autres rétrovirus que c'est un dimer qui a été encapsidé mais que la stabilité du dimer dépendait de la maturation de la protéine Gag (256,257). De plus, chez MoMuLV, les résultats d'une étude structurale ont démontré que la dimérisation de l'ARN Ψ^+ provoquait une modification conformationnelle de l'ARN et que cette modification mettait en évidence des sites de hautes affinités pour la NCp10 (258). Enfin, des études plus récentes avec les méthodes d'imagerie montrent, qu'au moment de l'encapsidation, la fluorescence de l'ARN ne varie pas ce qui suggère que lors du bourgeonnement, les deux molécules d'ARN sont déjà associées (259,260). Ce résultat a été confirmé par les groupes de WS HU et de Mougél qui, en utilisant des ARN de couleurs différentes, montrent clairement que de manière Gag dépendante, l'ARN génomique se dimérise au niveau de la membrane plasmique (261) et dans le cytoplasme (262). En conclusion, il existe un lien étroit entre l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique et sa dimérisation suggérant que la protéine Gag possède une activité de chaperonne des AN.

En effet, plusieurs groupes ont exploré l'activité chaperonne des AN de Gag. Cette protéine est capable d'interagir avec les acides nucléiques d'une manière non-spécifique, de

déstabiliser leur structure et d'initier l'hybridation de tRNA^{Lys3} sur la séquence PBS "Primer Binding Site" du génome viral (229,247,263). Le domaine NCp7 de Gag nommé Gag(NC) est responsable de l'activité chaperonne de cette protéine car une protéine Gag délétée du domaine NCp7 se trouve incapable d'accomplir ces activités (247). Cependant, les travaux récents de la littérature montrent que la propriété de chaperonne d'acides nucléiques de Gag est moins efficace comparativement à celle de la NCp7 (102,229,244,247). En effet, Gag hybride le tRNA^{Lys3} au PBS avec une vitesse inférieure à la NCp7 et, à forte dose, Gag inhibe le transfert de brin.

De manière intéressante, il a été montré qu'un facteur cellulaire telle que la hélicase A humaine (RHA) pouvait augmenter l'activité chaperonne de Gag, notamment lors de l'hybridation du tRNA^{Lys3} sur le PBS (264). Cependant, le mécanisme de cette augmentation reste peu décrit, nécessite l'ARN mais ne semble pas passer par une interaction directe entre les deux protéines.

En conclusion, l'activité chaperonne de Gag est indispensable pour le recrutement et l'encapsidation spécifique de l'ARN viral lors de l'assemblage des particules virales (247) mais cette activité semble être faible ce qui peut suggérer qu'au moment de sa traduction, la protéine Gag soit capable de recruter un partenaire cellulaire lui permettant, par son activité chaperonne de dimériser efficacement l'ARN génomique viral afin de faciliter son encapsidation dans la particule naissante.

Protéines ribosomales

Les protéines ribosomales jouent un rôle important dans la biogenèse des ribosomes bactériens (70S) ou eucaryotiques (80S). De plus, ces protéines, hautement conservées parmi les différentes espèces régulent leur propre expression (265-267).

La première investigation de l'activité chaperonne des acides nucléiques des protéines ribosomales a été faite sur la protéine S12 de chez *E.coli*. Ces travaux ont montré que la S12 pouvait augmenter l'épissage des introns de la thymidylate synthase et qu'elle améliorerait ainsi le clivage par le ribozyme (268). Une autre étude est réalisée sur les protéines de la grande sous unité ribosomal de *E.coli* et a montré qu'environ 1/3 de ces protéines possédait une activité de chaperonne en stimulant l'épissage en trans des introns (269). De plus la

protéine L1 de la grande sous unité ribosomale de *E.coli* présente un fort pouvoir d'épissage en cis et en trans ce qui permet de la considérer comme ayant une forte activité de chaperonne des AN (270).

Enfin, il a été récemment montré que la protéine S1 d'*E.coli* interagissait avec les ARNm et déstabilisait leur structure, ce qui a un effet sur la traduction de l'ARN et peut influencer l'expression des protéines bactériennes qui jouent différent rôle dans le cycle bactérien. Ces différents aspects sont validés par des tests *in vitro* et *in cellulo*, soulignant que cette protéine possédait une activité de chaperonne des acides nucléiques (271).

Enfin, notre équipe à montrer, pour la première fois, contrairement aux autres équipes qui ont travaillé sur des protéines bactériennes, que la protéine ribosomale humaine RPL7 de la grande sous-unité ribosomale possède une activité chaperonne des acides nucléiques (272) (Karnib H, en cour de préparation). Ainsi, toutes ces données montrent que plusieurs protéines ribosomales ont une activité de chaperonne des AN et propose que cette activité soit indispensable lors de l'assemblage et la biogenèse des ribosomes, ainsi que lors de la traduction pour permettre la réorganisation structurale de l'ARN messenger en cours de lecture.

Objectif du travail de thèse

L'ARN non épissé d'HIV, qui est exporté de manière REV dépendant, possède un double destin ; celui d'être un ARN messager, traduit en protéines Gag et Gag-Pol et celui d'être un ARN génomique encapsidé dans la particule virale. Le modèle actuel décrivant la formation du virus suggère que c'est la dimérisation de l'ARN génomique qui serait l'élément initiant cet assemblage. Cependant, la faible efficacité de Gag en tant que chaperonne des acides nucléiques a permis de suggérer que la protéine Gag serait capable de recruter un partenaire cellulaire qui, grâce à son activité chaperonne, pourrait améliorer l'activité de la protéine virale. Dans ce cadre, le laboratoire a entrepris la recherche de partenaires cellulaires grâce à un test de double hybride à haut débit en utilisant Gag et NCp7 comme appât. Parmi les différentes protéines cellulaires identifiées (Richard Benarous *et al*, CellVir, Paris) nous nous sommes intéressés à la protéine ribosomale RPL7, appartenant à la grande sous unité ribosomale 60S. Par ailleurs, le choix de la RPL7 réside dans le fait que, d'une part, cette protéine interagit avec une forte affinité avec les ARN, notamment des ARN viraux, d'autre part, plusieurs protéines appartenant à la grande sous-unité ribosomale chez *E.coli* possèdent une activité de chaperonne des acides nucléiques.

Les travaux initiés au laboratoire par Hala El Mekdad, qui a soutenu sa thèse en avril 2014, ont permis de confirmer l'interaction entre Gag et la RPL7 dans des cellules HeLa, les CEM-SS (lignée cellulaire lymphoblastoïde) et les cellules primaires PBL grâce aux techniques de double hybride, de co-immunoprécipitation et d'imagerie quantitative. Ces travaux ont montré que : 1- le domaine NC de Gag est important dans l'interaction Gag-RPL7, notamment ses deux motifs dactyles, 2- cette interaction est indépendante de l'ARN, 3- la RPL7 est encapsidée dans les particules virales. (272)

J'ai participé à ce travail en déterminant les domaines de RPL7 reconnus par Gag et en proposant une fonctionnalité à cette interaction. Dans ce dernier cas, j'ai caractérisé l'activité de chaperonne des AN de la protéine RPL7 seule ou en présence de Gag et ainsi proposé un modèle selon lequel, au cours de l'assemblage, la protéine Gag pourrait recruter la RPL7 afin d'augmenter significativement son activité de chaperonne.

De plus, afin de mieux comprendre le mécanisme selon lequel le complexe Gag-RPL7 hybride des séquences d'AN complémentaire, j'ai étudié le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la RPL7, Gag ou du mélange Gag-RPL7. Pour cela, j'ai étudié en temps réel les réactions d'hybridation de cTAR à dTAR ou des mutants de ces oligonucléotides en présence de RPL7, Gag ou Gag-RPL7. Par ailleurs, j'ai effectué un test de dimérisation de l'ARN du VIH suivi en condition radioactive sur gel.

De plus, j'ai effectué d'autres travaux *in vitro* (anisotropie de fluorescence, DLS, calorimétrie, gel retard) pour mettre en évidence le complexe protéine-protéine.

Enfin, Ces travaux ont permis de voir des différences de mécanismes d'hybridation entre les protéines étudiés. De plus j'ai pu confirmer le modèle permettant de décrire l'amélioration de l'activité chaperonne des acides nucléiques de Gag proposé dans le paragraphe ci-dessus, ce qui a guidé à trois articles dont le premier est publié, le deuxième en cours de soumission et le dernier en cours de préparation.

Article 1

Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling.

Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling.

Mekdad HE^{*1}, Boutant E^{*1}, **Karnib H¹**, Biedma ME², Sharma KK¹, Malytska I¹, Laumond G², Roy M³, Réal E¹, Paillart JC³, Moog C², Darlix JL¹, Mély Y¹, de Rocquigny H¹.

¹Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74, Route du Rhin, 67401, Illkirch Cedex, France.

²Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), INSERM U1109, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000, Strasbourg Cedex, France.

³Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg Cedex, France.

Introduction

Lors de la phase tardive du cycle du VIH-1, le génome viral, intégré dans le génome de la cellule hôte, est transcrit par la machinerie cellulaire en ARN viral. Cet ARN, d'environ 10kDa et qui possède deux UTR en 5' et 3', est épissé puis exporté pour être traduit en protéines d'enveloppe et de régulations (38). Il peut aussi être directement exporté dans le cytoplasme où il sert d'ARN messenger (ARNm) qui est traduit en protéines structurales Gag et Gag-Pol. Cependant, ce même ARN correspond aussi à l'ARN génomique (ARNg), qui est reconnu spécifiquement par la protéine Gag (273). Cette interaction induit la dimérisation initiant l'assemblage et l'encapsidation d'un dimère d'ARNg dans les particules virales naissantes (30).

La protéine Gag est un précurseur protéique composé de plusieurs domaines qui sont la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC) et la p6 ainsi que des peptides SP1 qui séparent la CA de la NC et SP2 qui sépare NC de p6. La dimérisation de l'ARN génomique nécessite d'une part l'interaction du 5'-UTR avec la protéine Gag et d'autre part l'activité de chaperonne des acides nucléiques de Gag. Cette activité de chaperonne facilite le réarrangement des acides nucléiques vers leur conformation thermodynamiquement la plus stable, par exemple l'hybridation des séquences nucléotidiques entre elles. Cependant, les travaux du groupe de Kleiman ont montré que la protéine Gag sauvage avait une faible activité de chaperonne d'acides nucléiques (264). Ceci peut suggérer qu'au moment de sa traduction, la protéine Gag puisse recruter un partenaire cellulaire lui permettant, par son

activité de chaperonne, de dimériser l'ARN génomique viral afin de faciliter son encapsidation dans la particule naissante.

Dans ce cadre, notre équipe a entrepris la recherche de partenaires cellulaires grâce à un test double hybride à haut débit (R. Benarous et al, données personnelles). Parmi les différentes protéines cellulaires identifiées, nous nous sommes intéressés à la protéine ribosomal RPL7 appartenant à la grande sous unité ribosomal 60S. Cette protéine joue un rôle dans la biogénèse des ribosomes, dans l'association du ribosome au réticulum endoplasmique et dans le contrôle de la traduction (198,202). Par ailleurs, le choix de la RPL7 réside dans le fait que, d'une part, cette protéine interagit avec une forte affinité avec les ARN, notamment les ARN viraux et, d'autre part, que plusieurs protéines appartenant à la grande sous-unité ribosomale chez *E.coli* possèdent une activité de chaperonne des acides nucléiques comme les protéines L15, L16, L18, L19 (225,269,271).

Résultats

Dans cet article, nous avons montré que la protéine Gag du VIH-1 interagit avec la RPL7 humaine. Pour cela, nous avons fait un test de double hybride dans lequel la RPL7 a été fusionnée avec le gène de Gal4pAD et Gag avec le gène Gal4BD-Gag. Comme le montre la figure 1a de l'article, les levures exprimant Gal4AD-RPL7 et Gal4BD-Gag ont la capacité de croître sur le milieu sélectif dépourvu d'histidine contrairement aux levures exprimant Gal4AD-RPL7 et Gal4AD, Gal4AD et Gal4BD-Gag.

Puis, nous avons réalisé une co-immunoprécipitation (Co-IP) en utilisant un anticorps anti-CA (Figure 1b). Comme le montre la figure 1b de l'article, la RPL7 est présente en même temps que Gag (Figure 1b, piste 4) mais absente du lysat cellulaire contenant un vecteur vide (Figure 1b, piste 3) ou lorsque l'immunoprécipitation est effectuée sans anti-p24 (Figure 1b, piste 5). Ce résultat a été confirmé avec une Co-IP inverse en capturant Flag-RPL7 (Figure 1B, voie 8) et en révélant la protéine Gag-eGFP (Figure 1c voie 8).

Identification des domaines de Gag impliqués dans l'interaction avec la RPL7 et effet des acides nucléiques sur cette interaction

Une cartographie du domaine de Gag impliqué dans l'interaction avec la RPL7 a été effectuée par Co-IP avec des cellules exprimant Gag ou différents mutants de Gag. Ces mutants correspondent à des protéines Gag mutées dans le domaine interdistal (²⁹RAPRKK→RAPAAA), délétées d'un des deux doigts de zinc (GagΔZF1 et GagΔZF2) ou des deux en même temps (GagΔZF1ΔZF2) ou du domaine NC en entier (GagΔNC). La Co-IP montre que la RPL7 endogène a été immunoprécipitée par Gag, GagΔZF1, GagΔZF2 et GagRAPAAA (Figure 3a2, pistes 1, 3, 4 et 5) à des niveaux similaires. Par contre, l'interaction Gag-RPL7 est perdue dans les lysats cellulaires exprimant une protéine Gag délétée de son domaine NC ou de ces deux doigts de zinc (Figure 3 a2, pistes 2 et 6, respectivement). Ces résultats indiquent que les doigts de zinc jouent un rôle essentiel dans l'interaction entre Gag et la RPL7. Ce résultat a été confirmé par une Co-IP réalisée sur des cellules exprimant NCp7-eGFP et qui montre que la NCp7-eGFP a précipité la RPL7 endogène. Ainsi, la NC, sous forme mature ou sous forme de GagNC, interagit avec la RPL7 endogène.

Ensuite, sachant que Gag et RPL7 sont des protéines interagissant avec les acides nucléiques, une Co-IP entre Gag et la RPL7 endogène a été effectuée en présence de la RNase. Les résultats montrent qu'en présence ou absence de la RNase les deux protéines sont capables d'interagir indépendamment des acides nucléiques.

Identification des domaines de RPL7 impliqués dans l'interaction avec GagNC.

Afin d'identifier les domaines de RPL7 impliqués dans le complexe Gag-RPL7, les différents domaines de RPL7 ont été clonés avec un marqueur Flag localisé sur le N-ter de la protéine. Ces domaines ont été choisis sur la base de leur localisation cellulaire et de leur propriété de liaison aux membranes ou aux acides nucléiques (201). Nous avons vérifié par un anticorps anti-Flag que les différentes constructions ont un niveau d'expression similaire sauf dans le cas de la construction D (Figure 5). Puis les cellules HeLa ont été co-transfectées avec deux plasmides codant respectivement Gag-eGFP et Flag-RPL7 et l'immunoprécipitation a été effectuée en utilisant un anticorps anti-eGFP. Après précipitation de Gag-eGFP, l'utilisation de cet anti-Flag montre que les constructions de RPL7 possédant les parties N ou C

terminales (Figure 5, pites B, C, E et F) ont été co-précipitées par Gag alors que leur délétion se traduit par une perte de reconnaissance RPL7-Gag (Figure 5, piste D). L'efficacité de cette co-précipitation semble inférieure à celle obtenue avec la protéine entière suggérant que d'autres domaines de RPL7 sont importants comme le montre la perte de l'activité de G conservant la partie C terminale mais délétée d'une partie centrale. De manière intéressante, les deux domaines N et C terminaux qui semblent importants pour cette interaction interagissent respectivement avec les acides nucléiques et les membranes qui sont deux fonctions retrouvées dans la protéine Gag.

La RPL7 humaine interagit avec Gag *in vitro*

Pour mener des études *in vitro*, la protéine Gag été clonée dans un plasmide pET28 par la société Epigex (Strasbourg) et la RPL7 par notre équipe selon un clonage gateway dans un plasmide PHGWA (un dérivé du plasmide pET). Puis les bactéries BL21(DE3) ont été transformées par l'un des deux plasmides, et incubées 4 heures à 37°C ou 16 heures à 18°C avec 1 mM d'IPTG respectivement pour RPL7 ou Gag. La purification de RPL7 a été effectuée dans un milieu dénaturant suivant les conditions publiées par le groupe de G Dieci (274) et la purification de Gag a été effectuée selon le protocole de J Mak (275).

Après avoir purifié les protéines, Gag a été marquée par un chromophore à base de Nickel (trisNTA-Oregon Green) qui se fixe spécifiquement aux 6 histidines de Gag (276). Puis une anisotropie de fluorescence a été effectuée en titrant Gag-trisNTA-Oregon Green par la RPL7 non marquée. Les différentes valeurs d'anisotropie ont été analysées par l'équation de Scatchard

$$(S=So+(St-So)*(1+K*(Pt+n*Nt)-((1+K*(Pt+n*Nt))^2-4*n*Nt*Pt*K^2)^{0.5})/(2*n*K*Nt))$$

pour déterminer les constantes d'association, de dissociation et la stœchiométrie du complexe (Figure 1 du résumer).

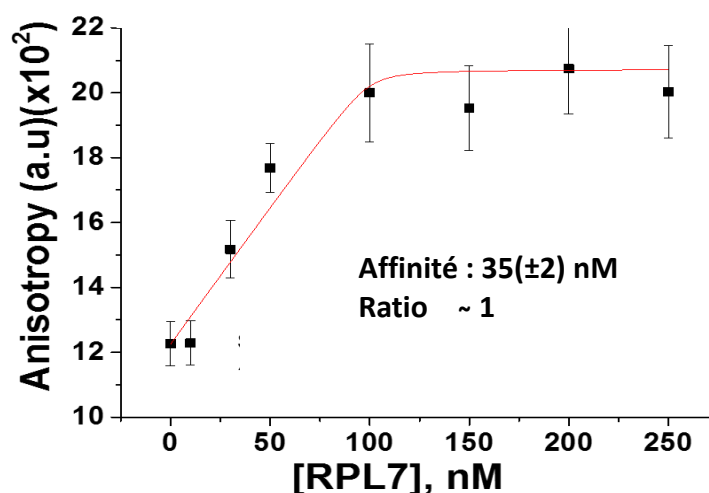


Figure 1 : Suivi de l'interaction Gag-RPL7 par anisotropie de fluorescence.

100nM de Gag-trisNTA-Oregon Green sont titrés avec une concentration variable de RPL7 (50mM Tris, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, pH= 7.4).

Ces résultats montrent que l'affinité entre Gag et RPL7 est d'environ 35nM et que le ratio entre ces deux protéines est de 1/1.

Dans un deuxième temps nous avons confirmé par des expériences de diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) l'interaction entre RPL7 et Gag sous la direction de S. Bernacchi (UPR 9002, IBMC, Strasbourg).

Nous avons estimé d'abord la taille de chaque protéine en solution dans le tampon 50mM Tris, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, pH= 7.4. Nos résultats montrent un diamètre hydrodynamique d'environ 7 nm pour la protéine RPL7 (Figure 2A) et d'environ 10 nm pour Gag. En assimilant les particules en solution à des sphères, ce diamètre serait compatible avec un dimère de RPL7 et avec un dimère-trimère de Gag. Il est à noter que le caractère parfaitement uni-modal et mono-disperse des distributions observés témoigne de la bonne qualité de nos protéines.

Puis, nous avons mélangé les deux protéines au ratio 1 :1 et observé une distribution bi-modale et mono-disperse du signal. Ce résultat indique clairement que les deux protéines s'associent sans former d'agrégats (Figure 2C du résumer). Le complexe minoritairement présente un diamètre d'environ 100 nm alors que le majoritaire présente un diamètre d'~ 225 nm (Figure 2C du résumer). Ainsi, d'une part les protéines RPL7 et Gag peuvent interagir

directement entre elles en absence d'acides nucléiques et, d'autre part, cette interaction requiert plusieurs copies de chaque partenaire.

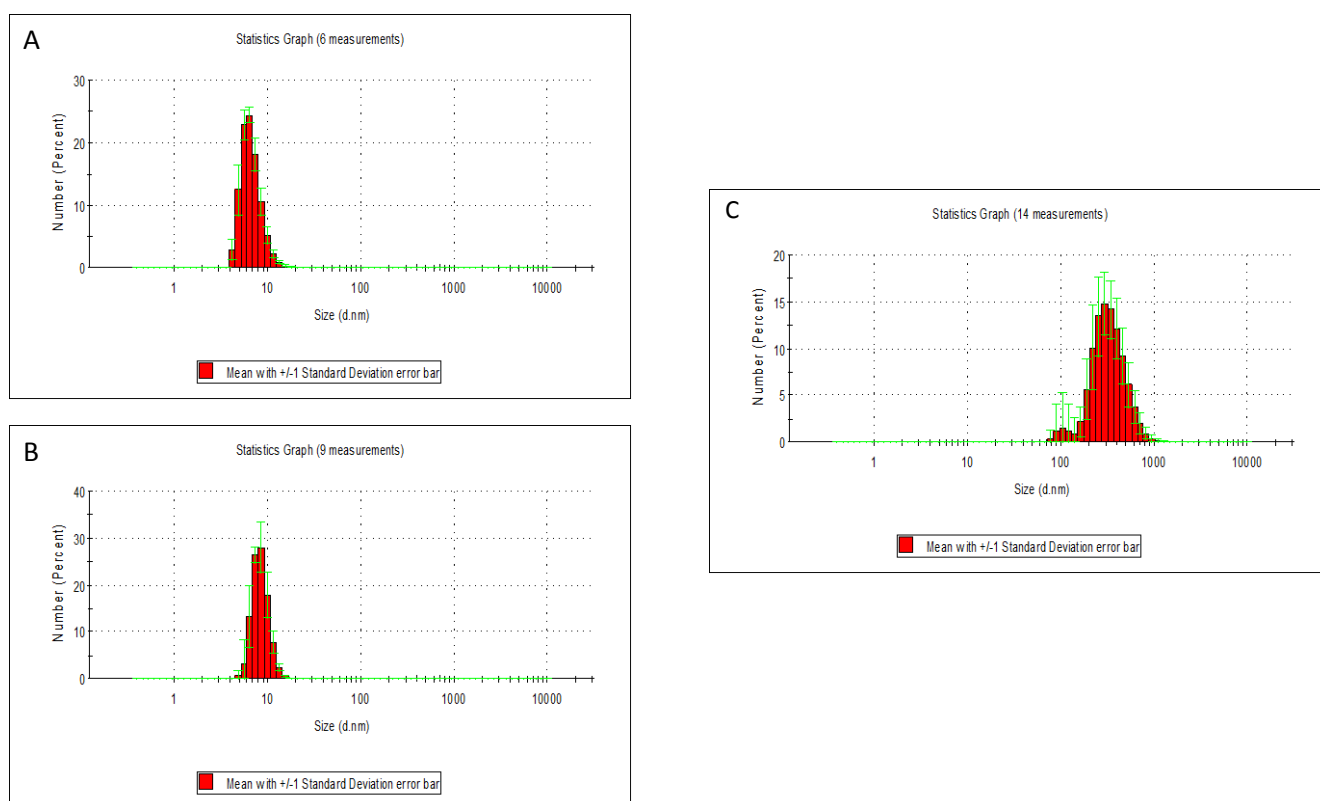


Figure 2 : Figure montrant la distribution en nombre de (A) 83µM de RPL7, (B) 5µM Gag ou (C) 5µM du complexe Gag-RPL7 mélangé selon un ratio de 1/1 (5µM Gag + 5µM RPL7) dans 50mM tris, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, pH 7.4 à 20°C

Les protéines RPL7, Gag et le complexe Gag-RPL7 possèdent une activité de chaperonne des acides nucléiques

Pour mettre en évidence que la RPL7 ait une propriété de chaperonne d'acide nucléique, on a utilisé un test développé par notre équipe et utilisé pour plusieurs protéines virales (218,219,232,277-280). Ce test consiste à suivre l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires ayant une structure en tige-boucle. Ces deux brins d'ADN correspondent à la version désoxyribonucléotidique de la séquence TAR (dTAR) et à son complémentaire (cTAR). Ces séquences ont été choisies pour mimer le premier saut inter-brins lors de la transcription inverse (281,282). Dans ce test, cTAR (appelé ci-dessous cTAR Beacon) possède en 5' une rhodamine et en 3' un dabcyI. Leur proximité, due à la structure en tige de cTAR,

donne lieu à un FRET important entre les chromophores (283). Lors de l'hybridation de cTAR avec dTAR, les deux chromophores se retrouvent éloignés, le FRET diminue et en conséquence l'intensité de fluorescence de la rhodamine augmente.

Dans ce test, les réactions sont effectuées dans des conditions de pseudo-premier ordre dans un tampon 50mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, pH= 7.4. Lorsque cTAR Beacon et dTAR sont incubés en présence d'un équivalent de RPL7, une augmentation rapide du signal est observée jusqu'à l'obtention d'un plateau après ~3000 secondes (Figure 6, courbe rouge). Ce plateau correspond au complexe étendu de cTAR et de dTAR (obtenu après hybridation à la chaleur, non montré). La protéine RPL7 est donc capable d'hybrider deux acides nucléiques entre eux. Lorsque ce test est effectué en présence d'un équivalent de la protéine Gag, le plateau est obtenu vers ~4000 sec (Figure 6, courbe bleu). Enfin, l'hybridation cTAR/dTAR a été suivie avec 1 équivalent du complexe Gag-RPL7 (0.5X RPL7 + 0.5X Gag) montrant que le plateau est atteint en moins de 2000 sec (Figure 6, courbe verte). Ainsi, ces résultats montrent que la RPL7 est une protéine chaperonne d'acides nucléiques plus efficace que Gag. Par ailleurs, le complexe Gag-RPL7 atteint la valeur maximale de la fluorescence environ 3 fois plus rapidement que Gag et 1.5 fois que la RPL7.

De plus, une hybridation de cTAR à TAR (ARN) a été effectuée et les résultats obtenus sont similaires que ceux trouvés dans le cas de cTAR/dTAR. Cela confirme que la RPL7 est une protéine chaperonne capable de former des hétéroduplexes avec une efficacité supérieure à Gag et que le mélange Gag-RPL7 possède une activité chaperonne supérieure à chaque protéine seule.

Pour confirmer l'activité chaperonne de nos protéines, un test de dimérisation de la région 5' de l'ARN génomique viral a été effectué avec J.C. Paillart (IBMC, Strasbourg). Ce test consiste à utiliser un ARN possédant l'intégralité de l'UTR5' du VIH, notamment le domaine Ψ responsable de la dimérisation de l'ARN génomique (221,223). Dans ce test, l'ARN de 600pb est incubé avec différentes concentrations de protéines pendant 30 minutes à 37°C. Après extraction au phénol/chloroforme, la réaction est suivie par gel d'agarose en condition native. Les résultats de ce test montrent que le pourcentage de dimère formé en présence de la RPL7 est supérieur à celui formé en présence de Gag. De plus, en accord avec les données précédentes, le mélange Gag-RPL7 forme les dimères d'ARN plus efficacement que chaque protéine seule (Figure 3 du résumer).

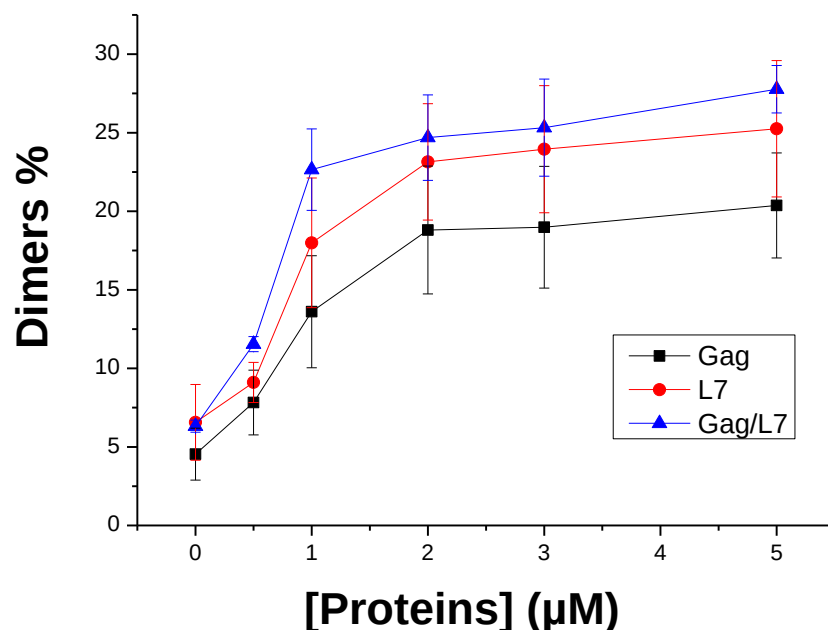


Figure 3 : Dimérisation de l'ARN (1-600) en fonction de la concentration en protéine. L'ARN correspond à un mélange contenant 0.2μg d'ARN froid et 10000 cpm d'ARN radioactif. La concentration de chaque protéine ou du mélange varie de 0μM à 5μM. La réaction a lieu dans 250 mM cacodylate de sodium, 250 mM NaCl/KCl, 0.5 mM MgCl₂, pH=7.5 à 37°C pendant 30 minutes. Le pourcentage de dimères est reporté en fonction de la concentration de protéine : Gag (courbe noire), RPL7 (courbe rouge) et Gag-RPL7 (courbe bleue).

Discussion

Sachant que l'activité de chaperonne des acides nucléiques de Gag était décrite comme étant relativement faible (264), nous avons cherché à identifier un partenaire cellulaire qui pourrait être recruté par la protéine virale. Parmi les différentes protéines trouvées, nous nous sommes intéressés à la RPL7 et pu démontrer par plusieurs approches que les doigts de zinc de GagNC interagissaient avec le domaine N et/ou C terminal de la RPL7 et que l'ARN ne servait pas de matrice à cette interaction. De plus, en utilisant les protéines pures et plusieurs méthodes de biophysiques, nos résultats montrent une interaction directe entre les deux protéines. Cette interaction semble indépendante de l'assemblage de Gag puisque des mutations dans MA et CA n'ont pas d'effet sur cette interaction, en accord avec le fait que la RPL7 interagisse aussi avec la NCp7 maturée.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la RPL7 possédait une activité chaperonne des acides nucléiques. En effet, cette protéine est capable d'hybrider cTAR à dTAR ou TAR mais aussi de dimériser des ARN viraux de grande taille. Cette activité était déjà publiée pour les protéines ribosomales d'*E.coli* (225,269,271) mais pas sur des protéines ribosomales de cellules eucaryotes. Cette activité est efficace en utilisant un rapport protéine/ acide nucléique de 1/1 alors que la NCp7 (1-55 a.a) et NCp7 (11-53) nécessitaient l'ajout de 3 et 6 protéines respectivement pour un acide nucléique. Par ailleurs, cette activité chaperonne de la RPL7 semble plus efficace que celle de Gag car le plateau correspondant à l'hybridation est obtenu 2 fois plus rapidement ou, dans le cas de la dimérisation, à une concentration inférieure. De manière plus intéressante, nous avons montré que le mélange Gag-RPL7 possède une activité chaperonne supérieure à chaque protéine seule, les constantes des réactions montrant un effet additif des deux protéines. En fonction de ces résultats, nous avons donc proposé un modèle fonctionnel à cette interaction, à savoir que la RPL7 pourrait être recrutée par Gag afin de faciliter son activité de chaperonne et ainsi promouvoir l'initiation de l'assemblage au détriment de la traduction.

RESEARCH

Open Access



Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling

Hala El Mekdad^{1†}, Emmanuel Boutant^{1†}, Hassan Karnib¹, Marina E. Biedma², Kamal Kant Sharma¹, Iuliia Malytska¹, Géraldine Laumond², Marion Roy³, Eléonore Réal¹, Jean-Christophe Paillart³, Christiane Moog², Jean Luc Darlix¹, Yves Mély¹ and Hugues de Rocquigny^{1*} 

Abstract

Background: In HIV-1 infected cells, the integrated viral DNA is transcribed by the host cell machinery to generate the full length HIV-1 RNA (FL RNA) that serves as mRNA encoding for the Gag and GagPol precursors. Virion formation is orchestrated by Gag, and the current view is that a specific interaction between newly made Gag molecules and FL RNA initiates the process. This in turn would cause FL RNA dimerization by the NC domain of Gag (GagNC). However the RNA chaperoning activity of unprocessed Gag is low as compared to the mature NC protein. This prompted us to search for GagNC co-factors.

Results: Here we report that RPL7, a major ribosomal protein involved in translation regulation, is a partner of Gag via its interaction with the NC domain. This interaction is mediated by the NC zinc fingers and the N- and C-termini of RPL7, respectively, but seems independent of RNA binding, Gag oligomerization and its interaction with the plasma membrane. Interestingly, RPL7 is shown for the first time to exhibit a potent DNA/RNA chaperone activity higher than that of Gag. In addition, Gag and RPL7 can function in concert to drive rapid nucleic acid hybridization.

Conclusions: Our results show that GagNC interacts with the ribosomal protein RPL7 endowed with nucleic acid chaperone activity, favoring the notion that RPL7 could be a Gag helper chaperoning factor possibly contributing to the start of Gag assembly.

Keywords: HIV, Gag, RPL7, Interaction, Chaperone activity, Nucleocapsid

Background

In HIV-1 infected cells, the integrated viral DNA is transcribed by the host cell machinery generating the full-length viral RNA (also referred to FL RNA), a large fraction of which undergoes splicing to give rise to single and multi-spliced viral mRNAs [1]. Once exported

from the nucleus to the cytoplasm, the FL RNA can be recruited by active ribosomes to direct synthesis of the Gag and GagPol precursors [2]. In infected cells, Gag orchestrates virion formation in a process that necessitates two platforms. The first one is thought to be the FL RNA acting as a scaffold for Gag oligomerization upon binding. The second platform corresponds to the phospholipid bilayer of the plasma membrane in which Gag-FL RNA complexes are progressively anchored by the N-terminus of the Gag matrix (MA) domain [3, 4].

The Gag polyprotein precursor is formed of several domains that are the matrix (MA), capsid (CA),

*Correspondence: hderocquigny@unistra.fr

[†]Hala El Mekdad and Emmanuel Boutant are co-first authors

¹ Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74, Route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article

nucleocapsid (NC) and p6 as well as the spacer peptides p2 and p1 flanking NC [5, 6]. The FL RNA has a long 5' untranslated region (UTR) containing a specific packaging signal composed of four stem-loops that mediate the binding of the NC domain of Gag (GagNC) and subsequently the formation of a dimeric FL RNA genome present in the viral particle [7–15]. This FL RNA dimerization is driven by the nucleic acid chaperone activity of GagNC [16–19] that directs structural rearrangements of nucleic acid molecules which rapidly reach their most stable structure [20, 21]. However, it was found that GagNC chaperone activity was low as compared to the mature NCp7 protein present in infectious virions [22–24]. Along this line, GagNC was also shown to hardly anneal primer tRNA^{Lys,3} to the Primer Binding Site (PBS), thus causing a profound defect in viral DNA synthesis [25–27].

This prompted us to look for host chaperoning factors cooperating with GagNC. Interestingly, several host proteins potentially interacting with Gag have been identified [28–30]. One of these proteins is RPL7 which is located at the surface of the large (60S) ribosomal subunit [31, 32] (referred in the recent nomenclature to as RPL30 [33]). RPL7 interacts with RNA [34, 35] and is involved in ribosome biogenesis [36] and the regulation of mRNA translation [37]. Since several *E. coli* ribosomal proteins behave as RNA chaperones [38, 39], we hypothesized that RPL7 may be endowed with chaperone activity and may thus cooperate with Gag to direct nucleic acid rearrangements.

By means of yeast two-hybrid and co-immunoprecipitation experiments, we confirmed the interaction between Gag and RPL7 and showed that both the N- and C-termini of RPL7 as well as the NC domain of Gag are the main determinants for this interaction. Also, the Gag–RPL7 interaction seems to be independent of cellular RNA and on Gag assembly suggesting that Gag monomers or small Gag oligomers could recruit RPL7 during the translation process. Using an in vitro model assay [19], RPL7 was found to exhibit a higher nucleic acid annealing activity than Gag, and that both proteins can act in concert to direct the rapid annealing of complementary RNAs and DNAs. Taken together, our data suggest that RPL7 may assist GagNC at the very beginning of assembly by augmenting its chaperone activity.

Results

HIV-1 Gag interacts with the cellular ribosomal protein RPL7

The interaction between RPL7 and Gag was identified by mass spectroscopy [28, 29], sedimentation assay [30] and a high throughput two-hybrid screen (R. Benarous, personal communication). To confirm this interaction in

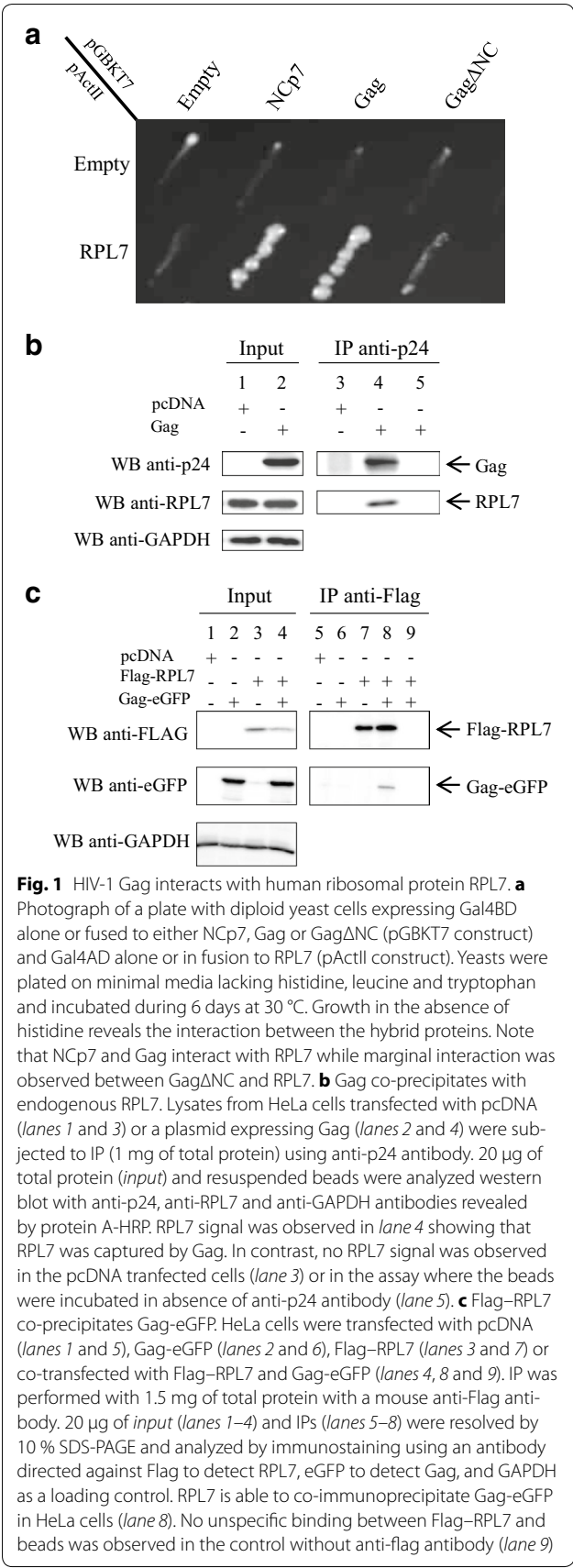
a pairwise two-hybrid analysis, a cDNA coding for the full length RPL7 was cloned in fusion with the Gal4p-AD. As seen in Fig. 1a, diploid yeast cells expressing Gal4AD-RPL7 and Gal4BD-Gag had the capacity to grow on the selective medium lacking histidine. Controls consisting in the co-expression of either Gal4AD-RPL7 and Gal4AD, Gal4AD and Gal4BD-Gag were unable to grow in the same conditions indicating that the Gal4 activation observed was not due to the transactivation of one of the construct alone (Fig. 1a). It is worth noting that interactions were not tested with Gag fused to Gal4AD, due to its toxicity for the yeast *S. cerevisiae*.

To confirm the Gag–RPL7 interaction found by two-hybrid analysis, we carried out co-immunoprecipitation (co-IP) experiments using an anti-CA (anti-p24) antibody (Fig. 1b). After HeLa cell transfection of DNA expressing Gag, the cell extracts were analyzed for the expression of Gag (Fig. 1b, lane 2) and endogenous RPL7 (Fig. 1b, lanes 1 and 2) using monoclonal anti-p24 and polyclonal anti-RPL7 antibodies, respectively (Input). Then, equal quantities of cell extract were incubated with mouse anti-p24 antibodies and protein A-beads. The immunopurified material was analyzed by western blot using mouse anti-p24 and rabbit anti-RPL7 antibodies (Fig. 1b, IP). As shown in Fig. 1b, RPL7 was present together with Gag (Fig. 1b, lane 4) but absent from the mock cell lysate (Fig. 1b, lane 3) or when immunoprecipitation was performed without anti-p24 (Fig. 1b, lane 5).

To confirm this result, we performed a reverse experiment. To this end, HeLa cells were transfected with a plasmid expressing Flag–RPL7 alone or with a plasmid expressing Gag-eGFP. HeLa cell lysates were analyzed by SDS-PAGE followed by western blot for Flag–RPL7 and Gag-eGFP expression using anti-Flag (Fig. 1c, lanes 3 and 4) and anti-eGFP antibodies (Fig. 1c, lanes 2 and 4), respectively. In parallel experiments, cell lysates were incubated with anti-Flag antibody to immunoprecipitate RPL7 (Fig. 1c, lanes 7 and 8). In the presence of immunoprecipitated RPL7, a specific Gag signal was observed with the anti-eGFP antibody (Fig. 1c lane 8). Interestingly, all controls failed to precipitate Gag (Fig. 1c, lanes 5, 6, 7 and 9) confirming a specific interaction between Gag and RPL7.

RPL7 interacts with Gag in HIV infected cells and is incorporated into virions

To analyze the Gag–RPL7 interaction in a viral context, CEM-SS cells were infected with HIV-1 LAI (CXCR4 strain). After 4 days, flow cytometry analysis showed that 62 % of the cells were infected (data not shown) [40]. Equal amounts of lysate from infected or naïve cells were analyzed by SDS-PAGE and by western-blotting using an anti-p24 antiserum. As seen in Fig. 2a (input), Gag and



processed Gag (p41 and p24) were detected in the lysate of infected cells (lane 2) but not in that of naïve cells (lane 1). Meanwhile, these lysates were incubated with anti-p24 antibody and Gag and processed Gag were immunoprecipitated from infected cells lysates (Fig. 2a, lane 5) but not from naïve cell lysates (Fig. 2a, lane 4). In addition, as a control, the infected cell lysate was incubated with protein A-beads without anti-p24 antibody and the absence of signal in lane 3 (Fig. 2a) indicated that neither Gag nor RPL7 had nonspecific interactions on the beads. Interestingly, incubation of this membrane with an antibody directed against RPL7 revealed that endogenous RPL7 was co-immunoprecipitated by Gag in such infected cells (Fig. 2a, lane 5).

In order to test whether the interaction between Gag and RPL7 promotes the incorporation of RPL7 into a more relevant physiologically model of virions, HIV-1 BaL produced in primary cells was purified by a gel exclusion method [40, 41]. RPL7 was detected in these purified HIV-1 particles (Fig. 2b) while no RPL7 was found in the supernatant of naïve primary cells (Fig. 2b, control). Taken together, these results show that RPL7 and Gag interact in a viral context and that RPL7 can be recruited into infectious HIV-1 particles.

To look for the possible role of the Gag–RPL7 interaction in HIV-1 replication, siRNA directed against RPL7 was transfected and found to induce a large decrease of RPL7 protein (data not shown). Nevertheless, other proteins such as actin, RPS14 and nucleolin were impacted indicating that silencing of RPL7 has a negative effect on the translation machinery [36]. Therefore, due to these limitations, we could not evidence any clear impact of the Gag–RPL7 interaction on HIV-1 replication.

NC zinc-fingers are key determinants for the Gag–RPL7 interaction

In order to further map the GagNC determinants responsible for the interaction with RPL7, co-IP assays were performed using a number of HIV-1 Gag proteins mutated in their NC domain (Fig. 3a1). To investigate the role of the NC zinc fingers, Gag proteins where either one of the two zinc fingers was removed (GagΔZF1 and GagΔZF2) were compared to a deletion mutant missing the entire NC domain (GagΔNC). To determine the role of the basic sequences surrounding the CCHC motifs, both zinc fingers were deleted (GagΔZF1ΔZF2) or the ³²RKK motif was substituted for AAA (GagRAPAAA). Expression of these Gag constructs was monitored by western blotting (Fig. 3a2, input). In parallel experiments, Gag and Gag derivatives were immunoprecipitated with anti-p24 antibody and membranes were immunoblotted with anti-p24 or anti-RPL7 antibodies followed by an incubation with protein A-HRP conjugate (Fig. 3a2, IP). GagNC

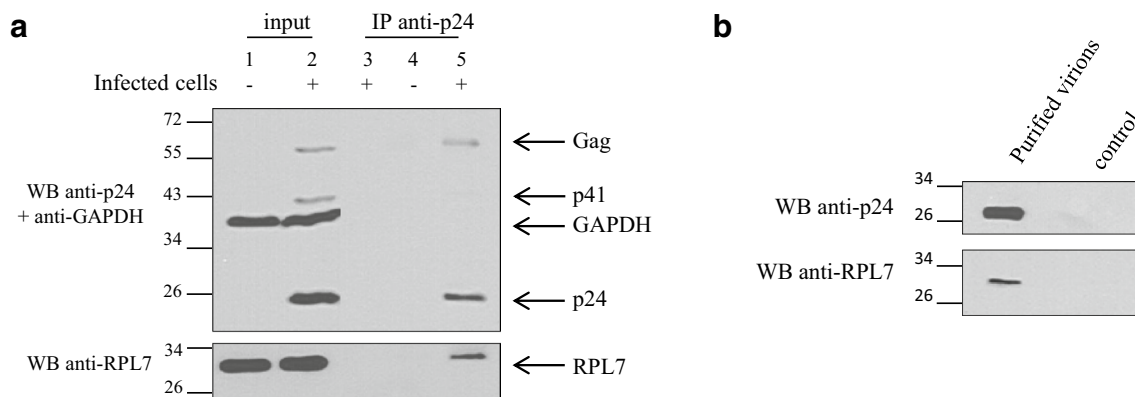


Fig. 2 Interaction of HIV-1 Gag and RPL7 in infected cells and virion incorporation of RPL7. **a** Interaction of HIV-1 Gag and RPL7 in infected cell. Cell lysates of naïve CEM-SS (Lanes 1 and 4) or of HIV-1 LAI infected CEM-SS (lanes 2 and 4) were subjected to IPs 3 days post infection using anti-p24 antibody and protein A beads. The IP was followed by western blotting with anti-p24 and anti-RPL7 antibodies revealed by protein A-HRP and anti-rabbit HRP conjugate, respectively. Additionally, the total amount of protein loaded on the gel was controlled by anti-GAPDH antibody (input, lanes 1 and 2). A bead control using the infected cell lysate in the absence of p24 antibody was also performed (lane 3), confirming the specific binding of Gag and its processed forms (p24, p41, p55). **b** RPL7 is incorporated into HIV-1 particles. HIV-1 BaL virus stock produced on PHA-activated PBMC were purified and concentrated before being analyzed by western blotting using anti-p24 and anti-RPL7 antibodies. The control represents the purified supernatant from mock-infected PBMC using the same purification protocol

mutants were immunoprecipitated (Fig. 3a2, lanes 1–6) with a higher efficiency as compared to the wild-type Gag protein (Fig. 3a2, lane 1), probably as a result of the masking of Gag epitopes due to the stronger ability of wild-type Gag to oligomerize, as compared to the Gag mutants [42–44]. These membranes were subsequently immunoblotted with the anti-RPL7 antibody, showing that endogenous RPL7 was captured by Gag, Gag Δ ZF1, Gag Δ ZF2 and GagRAPAAA (Fig. 3a2, lanes 1, 3, 4 and 5, respectively) at similar levels. In sharp contrast, RPL7 was poorly immunoprecipitated by Gag lacking either the entire NC domain or both zinc fingers (Fig. 3a2, lanes 2 and 6, respectively). Taken together, these results indicate that the ZFs but not the flanking basic sequences are key determinants for the interaction with RPL7.

Finally, a co-IP assay was carried out on cells expressing eGFP and NCp7-eGFP using an anti-GFP serum (Fig. 3b, input, lane 2 and 3). Endogenous RPL7 was co-eluted with NCp7-eGFP (Fig. 3b, lane 6) but not with the eGFP control (Fig. 3b, lane 5), thus confirming the two-hybrid screen (Fig. 1a). Taken together, these results indicate that NC, either in the form of GagNC or as mature NCp7, interacts with endogenous RPL7.

Gag–RPL7 interaction is RNA independent

The NC domain of Gag and RPL7 are RNA binding proteins [34, 35, 45]. To determine the importance of RNA for the Gag–RPL7 interaction, lysates of cell expressing Gag and endogenous RPL7 were treated with RNase prior to IP with an anti-p24 antiserum. After RNase treatment, Gag was immunoprecipitated and detected

by anti-p24 antibody (Fig. 3c, upper membrane). Then membranes were incubated with anti-RPL7 antibody and the endogenous protein was detected (Fig. 3c, lower membrane). Interestingly, the detection of RPL7 in the two samples shows that the RPL7 remains associated with Gag upon RNase treatment indicating that RNA may not be involved in the Gag–RPL7 interaction. Intriguingly, in a reproducible manner, the RPL7 signal was found to increase upon RNase-treatment (Fig. 3c) despite equal quantity of Gag immunoprecipitated on beads. To control the RNase activity, RNA extraction by phenol–chloroform was performed on an aliquot of cell lysate containing RNase. As seen in Additional file 1: Fig. S1, no RNA was detected in presence of RNase while a smear of RNA was obtained without treatment. In addition, similar experiments were carried out with cells expressing NCp7-eGFP. As indicated (Fig. 3b, lane 7) NCp7-eGFP was able to precipitate endogenous RPL7 in presence of RNase. Taken together, these results show that the interaction between Gag and RPL7 is probably not relying on a RNA template.

The Gag–RPL7 interaction is independent from Gag-membrane interaction or Gag–Gag oligomerization

During assembly, newly made Gag molecules are progressively anchored onto the internal leaflet of the plasma membrane via the Matrix N-terminus and its myristate group at position 2. The G2A mutation impairs Gag membrane binding [46, 47], causing its accumulation in the cytoplasm [48, 49]. The absence of Gag myristoylation

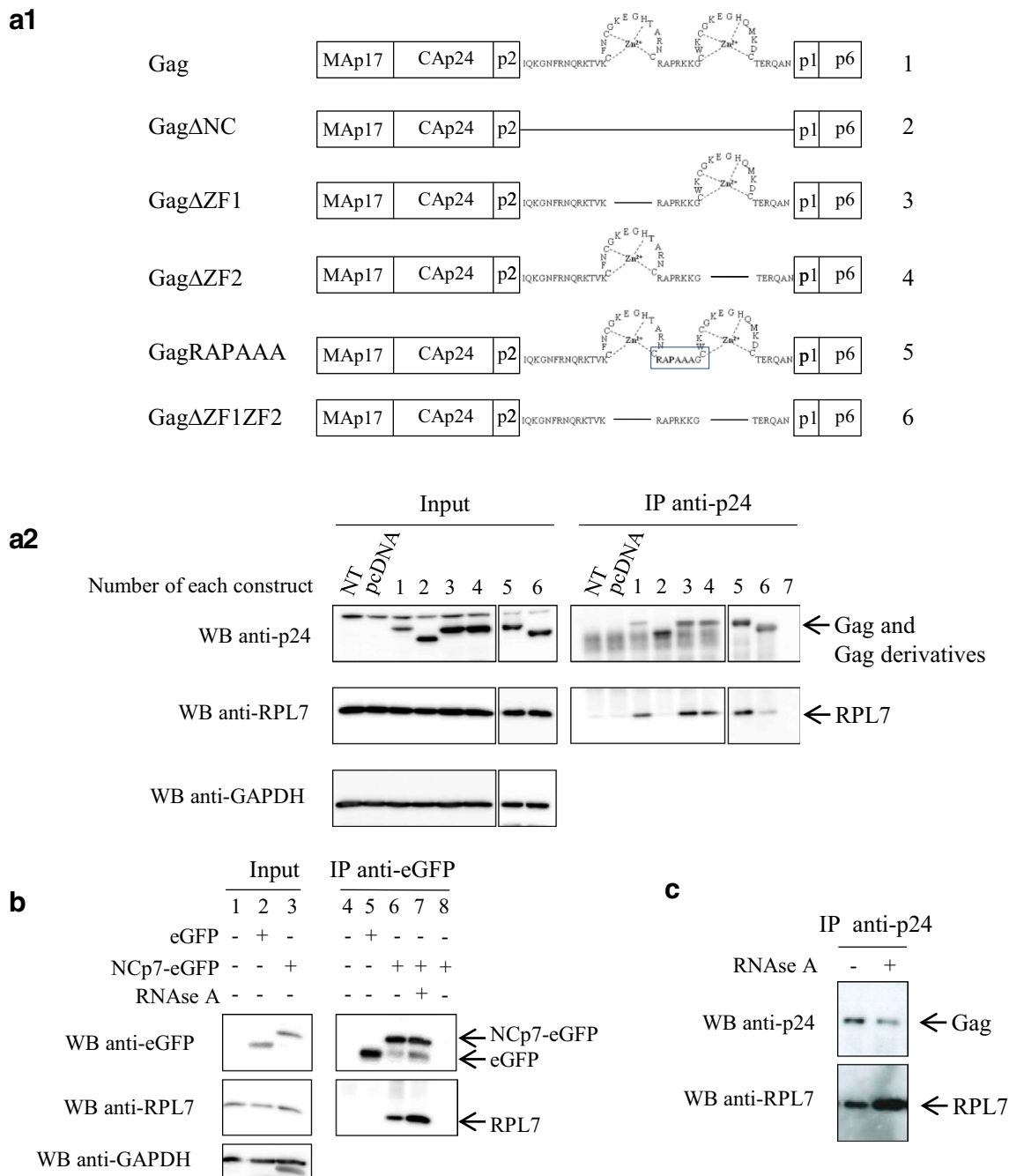


Fig. 3 The NC domain of Gag mediates Gag–RPL7 interaction in an RNA independent manner. **a1** Gag and truncated Gag constructs used in the present study. Numbers on the right correspond to numbers of lanes of **a2**. **a2** The NC domain of Gag is important for the RPL7–Gag interaction. HeLa cells were not transfected (NT) or transfected with pcDNA or plasmids encoding either Gag (construct 1), GagΔNC (construct 2), GagΔZF1 (construct 3), GagΔZF2 (construct 4), GagRAPAAA (construct 5) and GagΔZF1ZF2 (construct 6). IP was performed with 1 mg of total protein and with an anti-p24 antibody. 20 μg of cell lysate (input) or IP resuspended samples were resolved by 10 % SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using antibodies against p24, RPL7 and GAPDH revealed by protein A-HRP, anti-rabbit HRP conjugate or anti-mouse HRP conjugate, respectively. Nonspecific binding was not observed in the control without antibody (lane 7). **b** NCp7–RPL7 interaction is RNA independent. Cell lysate from HeLa cells transfected with empty pcDNA (lanes 1, 4) or plasmids coding for eGFP (lanes 2, 5) or NCp7-eGFP (lanes 3, 6). Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-eGFP and the immunoprecipitated material was examined by western blot using anti-eGFP, RPL7 and GAPDH antibodies. Lane 7 cell lysates expressing NCp7-eGFP were treated with RNase before immunoprecipitation. Lane 8 cell lysate expressing NCp7-eGFP was incubated with protein A beads but without anti-eGFP antibody. **c** Gag–RPL7 interaction is RNA independent. Cell lysate from HeLa cells transfected with Gag was treated with RNase. After RNase treatment, cell lysate was immunoprecipitated with anti-p24 antibody, and the immunoprecipitate was analysed by western blot using anti-p24 and anti-RPL7 antibodies

had no effect on the ability of Gag to immunoprecipitate RPL7 (Fig. 4, lane 9) indicating that Gag–RPL7 interaction does not require membrane association. Taking into account that G2A mutation also impairs, at least in part, Gag–Gag interaction [43, 44] this result indicates that Gag multimerization is probably not essential for the Gag–RPL7 interaction. In agreement with this conclusion, a Gag mutated in the capsid (M369A) with a severe defect in Pr55^{Gag} assembly [42, 44, 50–52] was found to immunoprecipitate RPL7 as efficiently as the wild-type Gag (Fig. 4, lane 10). Taken together these data show that the Gag–RPL7 interaction does not rely on the association of Gag with the plasma membrane and its oligomerization.

Major RPL7 determinants for the interaction with HIV-1 Gag

To map the RPL7 determinants involved in Gag interaction, we used a panel of deletion mutants (Fig. 5a). The design of these mutants is based on the previously reported roles of the different domains of RPL7. Constructs C, E and G contain RPL7 C-terminus which interacts with the plasma membrane (PM) and RNA [34, 53]. Constructs B, E and F contain the RPL7 N-terminus which also interacts with nucleic acids and possesses a leucine zipper that promotes RPL7 self-oligomerization

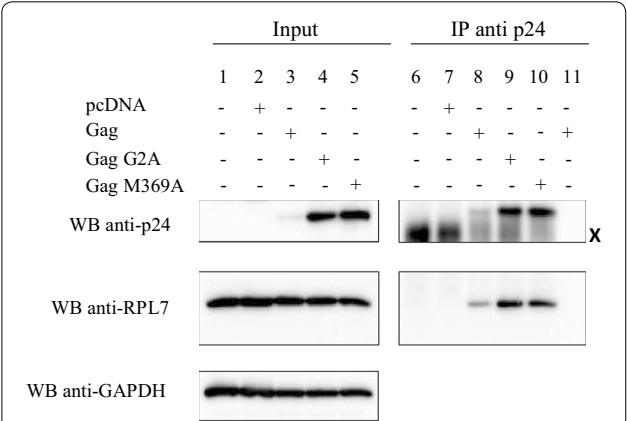


Fig. 4 The Gag–RPL7 interaction is independent on Gag myristoylation and oligomerization. Lysates from HeLa cells transfected with pcDNA (lanes 2, 7) or plasmids coding for Gag (lanes 3, 8 and 11), Gag-G2A (lanes 4, 9) and Gag-M369A (lanes 5, 10). Control: lysate from non-transfected HeLa cells (lanes 1, 6). The lysates were subjected to IP (1 mg of total protein) using anti-p24 antibody followed by western blot where 20 µg of total protein (input) and resuspended beads were analyzed with anti-p24, anti-RPL7 and anti-GAPDH antibodies revealed by protein A-HRP, anti-rabbit HRP conjugate or anti-mouse HRP conjugate, respectively. All Gag proteins (WT or mutants) interact with endogenous RPL7 (lanes 8–10). Neither Gag nor RPL7 bands were observed in non-transfected cells (lane 6), in pcDNA transfected cells (lane 7), or in the control of beads without anti-p24 (lane 11). X Heavy chain of anti-p24 used to IP Gag and Gag derivatives

[54]. To discriminate the importance of each terminus with the central region of RPL7, a construct was designed harboring only the central domain (RPL7 D) and compared with a construct containing both the N- and C- termini (RPL7 E). Also, to underline the importance of RPL7 3-D structure [32, 55], a partial deletion in the central domain of RPL7 C was designed (RPL7 G). The immunoprecipitation of the RPL7 mutants was tested using anti-eGFP antibodies on HeLa cells expressing Gag-eGFP. Each lysate tested had an equal level of Gag-eGFP expression (Fig. 5b, input). Moreover, RPL7 (Fig. 5b, input, lanes 2 and 4) and RPL7 B, C, E and G (Fig. 5b, input, lanes 5, 6, 8 and 10) were expressed at a similar level except for RPL7 D and F (Fig. 5b, input, lanes 7 and 9). As shown in Fig. 5b (IP), RPL7 B, E and F (lanes 5, 8 and 9) containing the N-terminus and RPL7 C containing the C-terminus (lane 6) were immunoprecipitated by Gag and visualized by anti-Flag (IP). This result points to the importance of both the N- and C-termini of RPL7 for the interaction with Gag. Indeed, despite the low expression level when both N- and C- termini were removed (RPL7 D, input, lane 7), this construct was not immunoprecipitated by Gag (IP, lane 7) suggesting that the central globular domain of RPL7 is dispensable for Gag interaction. In addition, there are likely other RPL7 domains involved in the interaction between RPL7 and Gag since deletion of the 155–168 sequence of construct C (RPL7 G) prevented Gag-mediated co-precipitation of RPL7 (Fig. 5b, IP, lane 10). However, this highly basic domain is located at the surface of the protein in a turn linking two α helices and the absence of interaction could result from a global change in the protein structure [32, 55]. Thus, our data show that the two terminal domains of RPL7 (residues 1–54 and 198–248) are required for Gag–RPL7 interaction.

RPL7, Gag and Gag–RPL7 mixture have DNA/RNA chaperone activity

Next, we investigated the nucleic acid annealing activity of RPL7, Gag, and RPL7 and Gag together using purified proteins (Additional file 2: Fig. S2). The annealing activity of RPL7 was examined using an in vitro assay based on the annealing of dTAR, the DNA equivalent of the HIV-1 transactivation responsive element (TAR) with its complementary sequence cTAR DNA labeled by Rh6G and Dabcyl at its 5' and 3' ends, respectively [19, 56–60]. As shown in Fig. 6a (panel I, black curve), the emission of 10 nM of free labelled cTAR is low as a result of the close proximity of cTAR ends inducing a strong fluorescence quenching of Rh6G by the Dabcyl group [61]. Next, addition of 1 equivalent of RPL7 to this solution did not induced any increase in Rh6G fluorescence emission (Fig. 6a, panel I, dotted line), suggesting

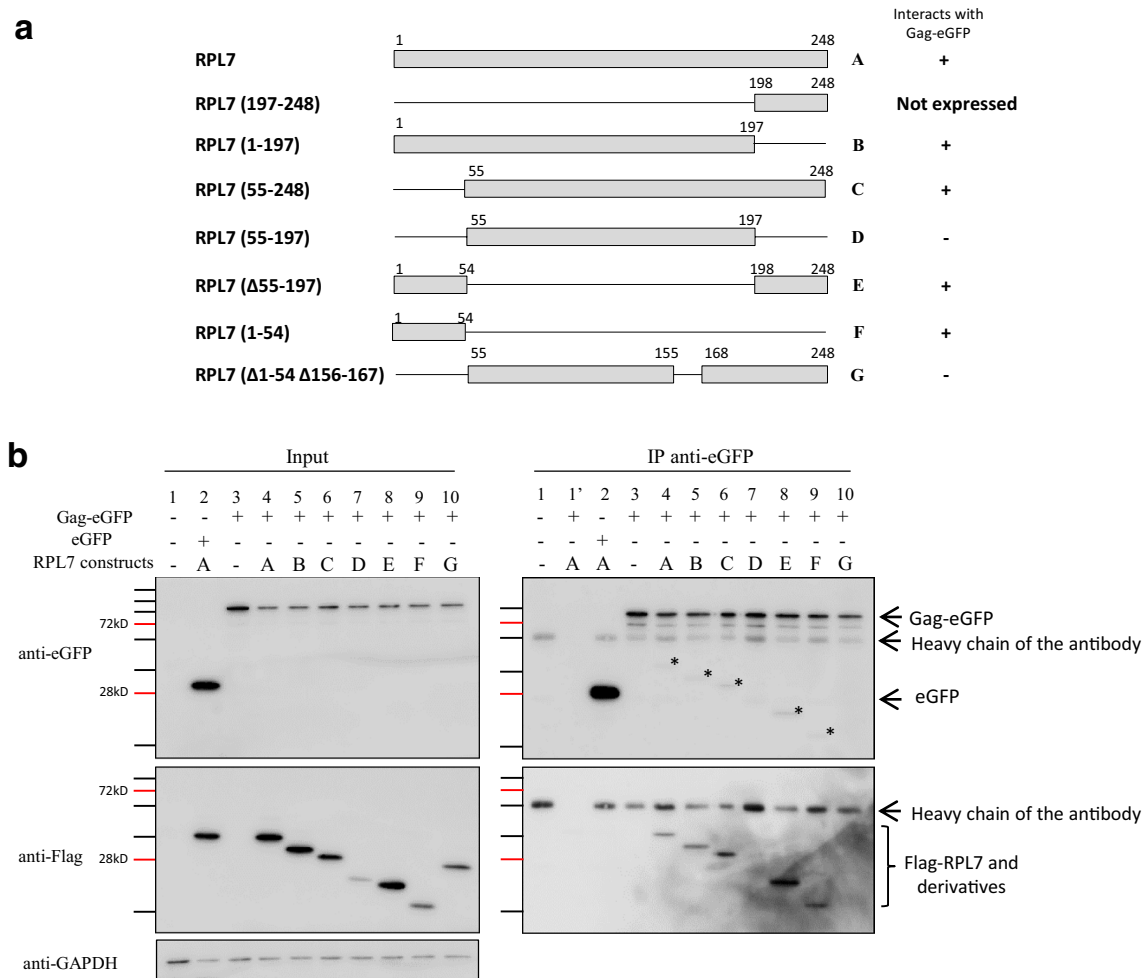
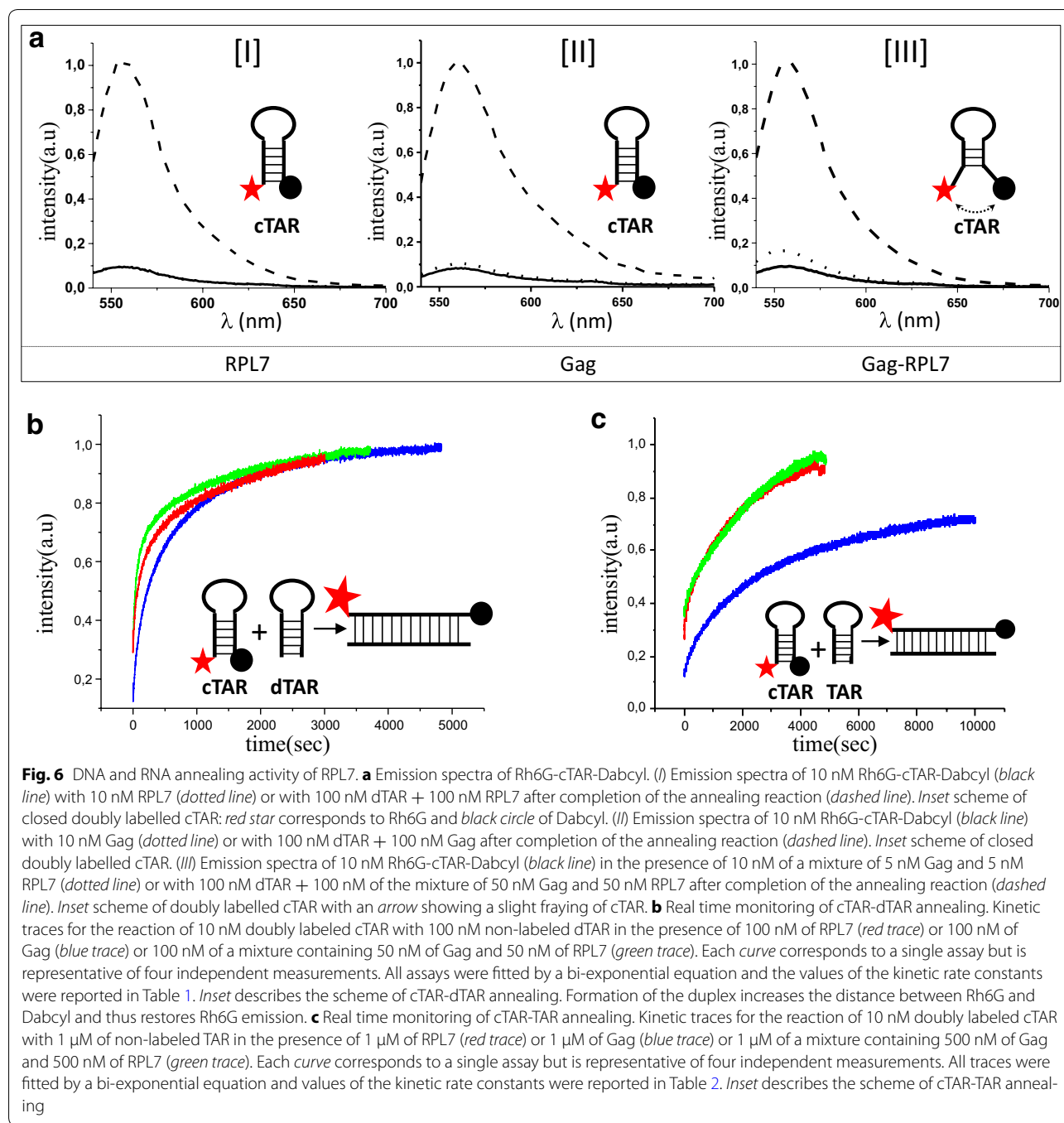


Fig. 5 Mapping of the Gag interaction domains in RPL7. **a** Scheme of Flag-RPL7 and its mutants: Flag-RPL7 mutants used in the present study are presented with a grey rectangle (RPL7 sequence conserved in the constructs) and with a black line (RPL7 sequence deleted in the constructs). Letters correspond to each construct and are used in **b**. On the right, (+) and (–) report the ability of each construct to be co-precipitated with Gag-eGFP. **b** Identification of Flag-RPL7 interaction with Gag-eGFP by immunoprecipitation experiments. HeLa cells were either not transfected (lane 1), or co-transfected with plasmids expressing eGFP and Flag-RPL7 (a, lane 2), Gag-eGFP alone (lane 3) or Gag-eGFP combined with Flag-RPL7 A (lane 4) or Flag-RPL7 B (lane 5), Flag-RPL7 C (lane 6), Flag-RPL7 D (lane 7), Flag-RPL7 E (lane 8), Flag-RPL7 F (lane 9), Flag-RPL7 G (lane 10). IP was performed with 1 mg of total protein and with mouse anti-eGFP antibody. 20 µg of total protein (input) and resuspended beads were resolved by 10 % SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using antibody against Flag followed by anti-mouse HRP conjugate. Membranes were stripped and re-blotted using mouse anti-eGFP antibody followed by anti-mouse HRP conjugate. Lane 1' corresponds to beads without antibody. Asterisk residual signal of the secondary anti-mouse interacting with primary anti-Flag antibody

that, in contrast to NCp7 [62, 63], RPL7 is unable to melt the lower half of the cTAR stem (panel I, insert). Addition of a mixture of 100 nM of RPL7 and 100 nM of non-labeled dTAR to obtain pseudo-first order conditions induced a sevenfold increase of Rh6G emission (Fig. 6a, panel I, dashed line and Table 1). This increase results from the annealing of doubly labelled cTAR to dTAR and can be monitored in real time (Fig. 6b, red curve). The plateau, which corresponds to the total annealing of cTAR and dTAR into an extended duplex (ED) (Fig. 6b, insert), was completed in ~2000 s, while more than one

day was needed in the absence of protein [57], indicating that RPL7 is endowed with a potent nucleic acid annealing activity. This kinetic curve was fitted by using a bi-exponential function with $k_{obs1} = 10.6(\pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{obs2} = 10.2(\pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). To further confirm the nucleic acid annealing activity of RPL7, dTAR was substituted for TAR RNA. Full annealing of cTAR with 1 µM of TAR was obtained in 3500 s with $k_{obs1} = 44(\pm 1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_{obs2} = 39(\pm 2) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 6c, red curve, Table 2), indicating that RPL7 is also able to promote annealing with RNA sequences, but less



efficiently than the corresponding DNA sequences. A similar difference in efficiency as a function of the nature of the nucleic acid was also reported for NCp7 and was attributed to the higher stability of the RNA as compared to the DNA sequences [57]. In conclusion, our data indicate that, by analogy to ribosomal proteins L1 and L19 from *E. coli* [38], the human RPL7 is endowed with efficient nucleic acid annealing activities.

Next, we investigated the annealing activity of Gag in similar conditions. Addition of 10 nM of Gag to 10 nM of doubly labelled cTAR induced a limited increase in the emission of Rh6G (Fig. 6a, panel II, dotted line), suggesting that Gag has marginal destabilization activity in these conditions. Addition of 100 nM of Gag and 100 nM of non-labeled dTAR resulted in a large increase in Rh6G emission (Fig. 6a, panel II, dashed curve) that can be

Table 1 Kinetic parameters for the annealing of cTAR to dTAR in the presence of Gag, RPL7 and the mixture of the two proteins

	RPL7	Gag	Gag + RPL7
a	0.58 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.80 ± 0.01
k_{obs1} (s ⁻¹)	$(10.6 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	$(5.3 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(14 \pm 0.7) \times 10^{-3}$
k_{obs2} (s ⁻¹)	$(10.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(8.2 \pm 0.8) \times 10^{-4}$	$(18 \pm 1) \times 10^{-4}$
If/Io	6.5 ± 0.6	6.8 ± 0.5	7.2 ± 0.2

Table 2 Kinetic parameters for the annealing of cTAR to TAR in the presence of Gag, RPL7 and mixture of two proteins

	RPL7	Gag	Gag + RPL7
a	0.41 ± 0.04	0.22 ± 0.028	0.67 ± 0.01
k_{obs1} (s ⁻¹)	$(44 \pm 1) \times 10^{-4}$	$(13.5 \pm 0.7) \times 10^{-4}$	$(57 \pm 1) \times 10^{-4}$
k_{obs2} (s ⁻¹)	$(39 \pm 2) \times 10^{-5}$	$(20.5 \pm 0.7) \times 10^{-5}$	$(47 \pm 1) \times 10^{-5}$
If/Io	8.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	8.45 ± 0.3

monitored in real time (Fig. 6b, blue curve). The annealing reaction took more than 4000 s to form the final ED providing values of $k_{obs1} = 5.3(\pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{obs2} = 8.2(\pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). When this experiment was performed with 1 μM of TAR, the time to complete the reaction was longer (8000 s) and both k_{obs1} and k_{obs2} were slower (Fig. 6c, blue curve and Table 2). For both cTAR-dTAR and cTAR-TAR systems, the $k_{obs1,2}$ values were about two to threefold higher with RPL7 as compared to Gag, indicating that RPL7 possesses a more potent nucleic acid annealing activity than Gag in the present conditions.

Finally, we investigated the chaperone activity of a Gag and RPL7 mixture. Interestingly, addition of 10 nM of Gag/RPL7 mixture (corresponding to 5 nM of Gag and 5 nM of RPL7) induces a ~2.5-fold increase of the doubly labelled cTAR fluorescence (Fig. 6a, panel III, dotted line), indicating that both proteins together can slightly destabilize the cTAR stem. Moreover, full annealing of cTAR with dTAR (Fig. 6b, green trace) or TAR (Fig. 6c, green trace) in presence of 100 nM of Gag/RPL7 mixture (corresponding to 50 nM of Gag and 50 nM of RPL7) was complete in less than 2000 and 4000 s, respectively for dTAR and TAR. Importantly, the $k_{obs1,2}$ values with the Gag/RPL7 mixture is up to 1.5 to 3-fold higher than for the individual proteins in the case of the cTAR-dTAR system and is up to 1.5 to 4-fold higher for the cTAR-TAR system (Tables 1, 2). The substantial increase in both the nucleic acid destabilization and annealing activity of the protein mixture as compared to each protein indicates

that the two proteins act in concert to promote nucleic acid annealing. These data suggest that Gag can improve its nucleic acid chaperone activity through the concerted activity of RPL7.

Discussion

In HIV-1 infected cells, virus assembly is orchestrated by the structural polyprotein precursor Gag, but where and how assembly initially takes place is poorly understood. The current view stipulates that Gag binds specific motifs in the 5' UTR of the FL viral RNA, which in turn causes its dimerization. The dimeric RNA genome is then thought to act as a platform to recruit Gag molecules via their NC domain [4, 7].

In order to better understand the initial step of Gag assembly, we wanted to identify cellular co-factors interacting with the NC domain of Gag. Among the possible candidates, RPL7 was shown to interact with both Gag and NCp7 [28]. Using yeast two hybrid and co-IP experiments, we confirmed that RPL7 interacts with Gag and NCp7 (Fig. 1) and that RPL7 can be incorporated in infectious particles (Fig. 2), together with other ribosomal proteins [64, 65]. Also, RPL7a can be incorporated into the virus as part of the Staufen1 ribonucleoprotein complex [66]; but RPL7 and RPL7a are different proteins since they exhibit only limited homology. As reported in Figs. 3 and 5 the Gag-RPL7 interaction relies on the two zinc fingers of GagNC and on both the N- and the C-terminal regions of RPL7. Data also indicates that the interaction of Gag with RPL7 is marginally dependent on RNA (Fig. 3) as well as on Gag oligomerization and its interaction with the plasma membrane (Fig. 4). Taken together, formation of the Gag-RPL7 complex seems to rely on direct protein-protein interaction or involves a still unidentified factor independent from the RNA-driven Gag assembly.

Noticeably, the amount of co-immunoprecipitated RPL7 with Gag was clearly increased upon RNase treatment (Fig. 3c), suggesting that RNA could outcompete the Gag-RPL7 interaction. Since the NC domain of Gag, as well as the N- and C- termini of RPL7 interact with RNA [34, 35], this suggests an overlap between the GagNC-RPL7 interacting domains and nucleic acid binding domains. Further studies on the tripartite complex Gag-RPL7-RNA should clarify a potential role of RNA, either cellular or viral, to regulate Gag-RPL7 complex formation.

We also show that RPL7 promotes the annealing of the complementary cTAR to dTAR or to TAR sequences (Fig. 6b, c). This property for a ribosomal protein to exhibit nucleic acid chaperone activity has been previously reported for an *E. coli* protein [38, 39] but not for a mammalian ribosomal protein. This nucleic acid

chaperoning activity of RPL7 leads us to propose that RPL7 could facilitate structural rearrangements of mRNA during translation. Meanwhile, we confirmed that Gag has a weak nucleic acid chaperone activity especially for RNA (Fig. 6c) [22–24], and that both proteins can act in concert to promote nucleic acid destabilization and annealing.

Thus, collectively, our data show that Gag interacts with RPL7, a cellular protein endowed with chaperone activity (Fig. 7). In the infected cell, when the unspliced HIV-1 FL RNA is exported from the nucleus to the cytoplasm and there transported to the virion assembly site by diffusion [67, 68] or by the microtubule/dynein pathway [69–72], it serves both as the gRNA and mRNA. As mRNA, it is recruited by the translational machinery to produce the Gag and GagPol polyproteins (Fig. 7—step 1) and as the gRNA it is selected by newly made Gag/GagPol. This latter specific interaction in turn causes its dimerization (Fig. 7—step 2) and tRNA^{Lys, 3} placement onto the genome (not shown in this scheme), concomitant with assembly (Fig. 7—step 3). However, the nucleic acid chaperone activity of GagNC is low (this study and [22–24, 73]) favoring the notion that Gag could recruit a cellular partner to facilitate these RNA annealing reactions. In line with this notion, the human RHA, also known as DHX9 was shown to participate in primer tRNA^{Lys, 3} annealing to the viral RNA [27]. Here, we go

further proposing a model where Gag physically recruits RPL7 in an RNA independent manner to enhance its chaperone activity. Since the annealing activity of the Gag–RPL7 complex corresponds to the sum of the activities of the individual proteins (Fig. 6b, c, green curves), we propose that the complex might rapidly direct HIV-1 FL RNAs dimerization and primer tRNA annealing at the start of Gag assembly (Fig. 7—step 3). In addition, Gag and RPL7 were shown to inhibit translation through an unknown mechanism [35, 37, 74–77], possibly causing a functional switch from RNA translation to Gag assembly. This hypothesis is presently under investigation.

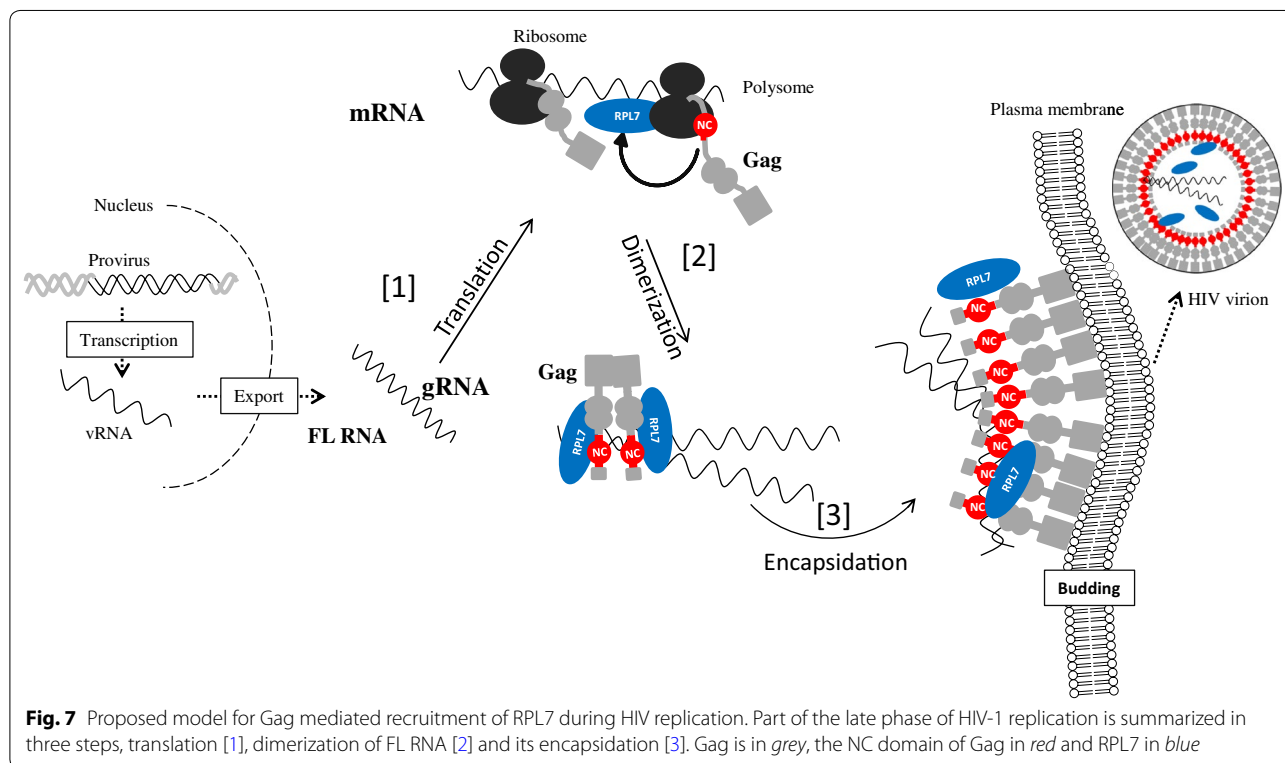
Conclusion

Here we report that the cellular ribosomal protein RPL7 appears to be a Gag helper chaperoning factor possibly acting in concert with the nucleic acid chaperone activity of GagNC during assembly. Further experiments are needed to elucidate the function of Gag–RPL7 on the translation of mRNA and the regulation of the balance between FL RNA translation and encapsidation.

Methods

Two-hybrid system

Using the Gateway™ recombination technology (Life Technologies) a human RPL7 cDNA was cloned into pActII in fusion with the Gal4p Activation Domain



(Gal4AD), Gag and NcP7 cDNA were cloned into pGBKT7 in fusion to the Gal4p DNA binding domain (Gal4BD). All pActII and pGBKT7 constructs were introduced into the *S. Cerevisiae* strain AH109 (MAT a, trp 1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, Δ gal4, Δ gal80, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ) or Y187 (MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met $^-$, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ) respectively using a LiCl procedure [78]. The transformed cells were selected for Leu or Trp auxotrophy on minimal media plates (6.8 g L⁻¹ YNB w/o amino acids (Sigma ref Y0626), 0.6 g L⁻¹ of Drop OUT (ForMedium LTD, Hunstanton, England), 2 % glucose, 20 g L⁻¹ Bacto-agar (Difco ref 214010). To carry out the two-hybrid test, yeast cells of each mating type transformed with the studied constructs were mated overnight and the diploids selected on a minimal medium depleted for Leu and Trp. The interaction between the two proteins tested was assayed by a 5-days growth of diploid yeasts on a minimal medium depleted for Leu, Trp and His.

Plasmid DNA

The human-codon-optimized Pr55^{Gag} and pNL4-3^{EGFP} encoding plasmids were kindly provided by David E. Ott (National Cancer Institute at Frederick, Maryland) and Barbara Muller (Department of Infectious Diseases, Heidelberg). Pr55^{Gag} plasmid was used to obtain modified Gag proteins (Gag Δ ZF1, Gag Δ ZF2, Gag Δ ZF1 Δ ZF2, GagRAPAAA and Gag Δ NC) by PCR-based site-directed mutagenesis following the supplier's protocol as previously described (Thermo Scientific, F541) [79]. Construction of plasmids expressing Gag-eGFP and NcP7-eGFP were already described [79, 80]. The 3X Flag RPL7 was obtained by cloning the RPL7 (NCBI ref NM_000971.3) cDNA in frame with three copies of the Flag tag (DYKDDDDK) into a pCI-neo (Promega) backbone using the GatewayTM recombination technology (Life technologies). The integrity of all plasmid constructs was assessed by DNA sequencing (GATC Biotech, Germany).

Cell culture and plasmid transfection

2 × 10⁵ HeLa cells (from ATCC, CCL-2 Amp, HeLa; Cervical Adenocarcinoma; Human) were cultured in 6-wells plate containing Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France) and 1 % of an antibiotic mixture (penicillin/streptomycin DE17-602E: Lonza, Bal, Switzerland, DE16-602E) at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. HeLa cells were transfected or co-transfected using jet PEITM (Life Technologies, Saint Aubin, France).

HIV purification and cell infection

CEM-SS cells [81] were infected with HIV-1 LAI. After 3 days of culture, the cells were split into two batches to analyze the percentage of infected cells by intracellular p24 staining, using anti-HIV-1 core protein p24 (Ref RD-1, Beckman Coulter), and to measure the expression of p24 and RPL7 by flow cytometry and by western blot [40, 82].

To analyze the presence of RPL7, HIV-1 strain BaL primary isolate (subtype B, HIV-1 R5 strain, provided through the AIDS Research and Reference Reagent Program from Dr. S. Gartner; Department of Neurology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD, and Drs. M. Popovic and R. Gallo, Institute of Human Virology, University of Maryland Biotechnology Institute and Department of Microbiology, Baltimore, MD) was produced on PHA-activated peripheral blood mononuclear cell (PBMC). The virus stock was purified from cultured supernatant by a gel-filtration exclusion method on Sephacryl S-1000 Superfine (Amersham) columns as described previously [41, 82]. Supernatant of mock-infected cells was purified in parallel. The purified fractions were concentrated by 80-fold through a 100 kDa cut-off polyethersulfone filter (Centricon 80 Plus Biomax Filter; Millipore, Molsheim, France) before analysis by western blot.

Immunoprecipitation and western blotting

HeLa cells were transfected and 24 h post-transfection, cells were harvested after trypsin treatment and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP40, 0.5 % SDS) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH). Cell lysates were cleared by centrifugation, and the supernatant corresponding to 1 mg of protein was incubated with primary antibody either mouse anti-p24 (Ref 6521 #24-4; AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH from Dr. Michael H. Malim), mouse anti-Flag (Sigma, F1804), or mouse anti-eGFP (Lifetech, A11120) for 2 h at 4 °C under continuous agitation. Protein A magnetic beads (Millipore, Pure Proteome, LSKMAGA10) were added for 90 min at 4 °C, and washed twice with ice-cold lysis buffer. Immunoprecipitated proteins (IP and Co-IP) and cell lysates (input) were analyzed by 10 % SDS-PAGE and membranes blotted either by mouse anti-p24 (Ref 6521 #24-4; AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH from Dr. Michael H. Malim), rabbit anti-Flag (Sigma, F1804), mouse anti-eGFP (Proteintech 66002-1), mouse anti-GAPDH (Millipore, MAB374) or rabbit anti-RPL7 (Abcam, ab72550) antibodies followed by anti-mouse HRP conjugate (Promega, W4021, 1:10,000) or

anti-rabbit HRP (Promega, W401B) or by Protein A HRP (horseradish peroxidase, invitrogen, 10-1023).

For RNase assay, the supernatant containing 1 mg of protein was incubated with a mixture containing 5 unit of RNase A and 200 units of RNase T1 (AM 2286) for 30 mn at room temperature. To verify RNase activity, RNAs were extracted by addition of phenol–chloroform (v/v) using the kit “Tri Reagent Protocol” from sigma Aldrich (T9424). After extensive vortex and centrifuge at 12,000g, the supernatant was mixed with RNA loading dye (New England Biolabs, B0363S), loaded on a TAE (Tris Acetate EDTA) 1× 1 % agarose gel and visualized by Ethidium Bromide. Ladder was supplied from New England Biolabs (N3232S) (Additional file 1: Fig. S1).

Protein purification

BL21 (DE3) cells were cultured in LB (Luria–Bertani) medium (1 % (w/v) peptone, 0.5 % (w/v) yeast extract, and 0.5 % NaCl). The medium was supplemented with kanamycin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and chloramphenicol (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in order to purify HIV-1 Gag, and kanamycin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and ampicillin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to purify human RPL7. Recombinant protein production was performed by inoculating a single colony in 50 mL LB containing antibiotics, and cultured at 37 °C, overnight with shaking at 220 rpm. The overnight culture was used to inoculate 1 L LB containing antibiotics. The culture was grown at 37 °C, 220 rpm, until an absorbance at 600 nm of 0.6 was reached. Protein expression was induced by addition of 1 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37 °C or of 0.5 mM IPTG for 16 h at 18 °C for RPL7 or Gag, respectively. Bacteria were harvested and snap frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. Both proteins were purified using previously described protocols [83, 84] and their purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis (Additional file 2: Fig. S2). Their concentration was measured from their absorbance at 280 nm using $\epsilon_{\text{RPL7}} = 27,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{\text{Gag}} = 63,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Monitoring nucleic acid annealing kinetics by fluorescence spectroscopy

Kinetic measurements were performed in pseudo first-order conditions by using 10 nM of cTAR labeled at its 5' and 3' ends by 6-carboxyrhodamine (Rh6G) and 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid (Dabcyl) with a 100 nM concentration of unlabeled dTAR (or 1 μM of TAR) as previously described [19, 85]. The reaction was monitored by recording the changes in the Rh6G fluorescence intensity at 555 nm (with excitation at 520 nm) with time. Proteins (Gag or RPL7) were added at a 1 molar ratio to each reactant separately and then, the reaction was initiated by mixing the

protein-coated oligonucleotides together. The apparent rate constants k_{obs} and the amplitudes (a) were determined from the kinetic traces by including a dead-time correction t_0 to take into account the delay between mixing the reactants and the start of the measurements. All fitting procedures were carried out with Origin™ 8.6 software based on nonlinear, least-square methods and the Levenberg–Marquardt algorithm. Emission spectra and kinetic traces were recorded with Fluorolog and FluroMax spectrofluorimeters (Jobin–Yvon Instruments, S.A. Inc.) equipped with a temperature-controlled cell compartment locked at 20 °C. All fluorescence intensities were corrected for buffer emission and lamp fluctuations. Experiments were performed at 20 °C in 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , pH 7.4.

Additional files

Additional file 1: Fig. S1. Control of RNase activity. Cells were transfected with a plasmid expressing Gag. After trypsin treatment and addition of lysis buffer, cell lysate was incubated with RNase cocktail containing RNase A and T1. Then an aliquot was treated with phenol–chloroform to extract the RNAs and the supernatant was loaded on 1% agarose gel. 1: cell lysate incubated with RNase cocktail. 2: cell lysate without addition of RNase cocktail.

Additional file 2: Fig. S2. Coomassie-stained SDS–PAGE of the purified human RPL7 and HIV-1 wild type Gag. The molecular mass of the two proteins is 31 kDa and 57 kDa, respectively.

Abbreviations

HIV-1: human immunodeficiency virus; RPL7: ribosomal protein L7; FL RNA: full length RNA; HRP: horseradish peroxidase; Gal4AD: Gal4p activation domain; Gal4BD: Gal4p DNA binding domain; eGFP: enhanced green fluorescent protein; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; Rh6G: rhodamine 6G; Dabcyl: 4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid; TAR: transactivation responsive element; dTAR: deoxyribonucleic equivalent of TAR; cTAR: complementary sequence of dTAR; ED: extended duplex.

Authors' contributions

HEM, EB, ER did plasmid construction and biochemical experiments, MEB, GL, CM expressed and purified viruses, HK, KKS, IM, MR, JCP performed biophysical studies and EB, JLD, YM and HdR wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74, Route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France. ² Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), INSERM U1109, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg Cedex, France. ³ Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

Acknowledgements

We thank Sylvia Dontenville, Nicolas Humbert, Romain Vauchelles and the Plate-forme d'Imagerie Quantitative (PIQ) for technical support and Richard Benarous, Erwann Le Rouzic (Mutabilis, Romainville) and Jean-Christophe Rain (Hybrigenics Service, Paris) for fruitful discussions and Johnson Mak for Gag purification advices.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by SIDACTION, the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), and Centre national de la recherche scientifique (CNRS). The p24 antibody (#6521) from Dr. Michael H. Malim was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Received: 8 March 2016 Accepted: 27 July 2016

Published online: 11 August 2016

References

- Stoltzfus CM. Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Adv Virus Res.* 2009;74:1–40.
- Bell NM, Lever AM. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* 2013;21:136–44.
- Butsch M, Boris-Lawrie K. Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion? *J Virol.* 2002;76:3089–94.
- Kuzembayeva M, Dilley K, Sardo L, Hu WS. Life of psi: how full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology.* 2014;454–455:362–70.
- Adamson CS, Freed EO. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol.* 2007;55:347–87.
- Sundquist W, Krausslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a006924.
- D'Souza V, Summers MF. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:643–55.
- Moore MD, Hu WS. HIV-1 RNA dimerization: it takes two to tango. *AIDS Rev.* 2009;11:91–102.
- Paillart JC, Shehu-Xhilaga M, Marquet R, Mak J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:461–72.
- Clever J, Sassetti C, Parslow TG. RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1995;69:2101–9.
- Chen J, Nikolaitchik O, Singh J, Wright A, Bencsik CE, Coffin JM, Ni N, Lockett S, Pathak VK, Hu WS. High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13535–40.
- Sakuragi J, Ueda S, Iwamoto A, Shioda T. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol.* 2003;77:4060–9.
- Lu K, Heng X, Summers MF. Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol.* 2011;410:609–33.
- Abd El-Wahab EW, Smyth RP, Mailler E, Bernacchi S, Vivet-Boudou V, Hijnen M, Jossinet F, Mak J, Paillart JC, Marquet R. Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. *Nat Commun.* 2014;5:4304.
- Lever AM. HIV-1 RNA packaging. *Adv Pharmacol.* 2007;55:1–32.
- Levin JG, Guo J, Rouzina I, Musier-Forsyth K. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2005;80:217–86.
- Rein A, Henderson LE, Levin JG. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci.* 1998;23:297–301.
- Darlix JL, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fosse P, Mauffret O, Mely Y. Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol.* 2011;410:565–81.
- Godet J, Mely Y. Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA Biol.* 2010;7:687–99.
- Herschlag D. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem.* 1995;270:20871–4.
- Kovacs D, Rakacs M, Agoston B, Lenkey K, Semrad K, Schroeder R, Tompa P. Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Lett.* 2009;583:88–92.
- Wu T, Datta SA, Mitra M, Gorelick RJ, Rein A, Levin JG. Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications. *Virology.* 2010;405:556–67.
- Cruceanu M, Urbaneja MA, Hixson CV, Johnson DG, Datta SA, Fivash MJ, Stephen AG, Fisher RJ, Gorelick RJ, Casas-Finet JR, et al. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:593–605.
- Wang W, Naiyer N, Mitra M, Li J, Williams MC, Rouzina I, Gorelick RJ, Wu Z, Musier-Forsyth K. Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein precursor NCp15 explain reduced viral infectivity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:7145–59.
- Cen S, Khorchid A, Gabor J, Rong L, Wainberg MA, Kleiman L. Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2000;74:10796–800.
- Guo F, Saadatmand J, Niu M, Kleiman L. Roles of Gag and NCp7 in facilitating tRNA(Lys)(3) Annealing to viral RNA in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2009;83:8099–107.
- Xing L, Liang C, Kleiman L. Coordinate roles of Gag and RNA helixase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA. *J Virol.* 2011;85:1847–60.
- Jager S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, Shales M, Mercenne G, Pache L, Li K, et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature.* 2012;481:365–70.
- Roy BB, Hu J, Guo X, Russell RS, Guo F, Kleiman L, Liang C. Association of RNA helicase A with human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Biol Chem.* 2006;281:12625–35.
- Chatel-Chaix L, Clement JF, Martel C, Beriault V, Gatignol A, DesGroseillers L, Moulard AJ. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2637–48.
- Wu WC, Liu HW, Lin A. Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS Lett.* 2007;581:651–7.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science.* 2010;330:1203–9.
- Anger AM, Armache JP, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, Beckmann R. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature.* 2013;497:80–5.
- von Mikecz A, Neu E, Krawinkel U, Hemmerich P. Human ribosomal protein L7 carries two nucleic acid-binding domains with distinct specificities. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:530–6.
- Hemmerich P, Bosbach S, von Mikecz A, Krawinkel U. Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *Eur J Biochem.* 1997;245:549–56.
- Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA.* 2008;14:1918–29.
- Neumann F, Hemmerich P, von Mikecz A, Peter HH, Krawinkel U. Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:195–202.
- Semrad K, Green R, Schroeder R. RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA.* 2004;10:1855–60.
- Duval M, Korepanov A, Fuchsbaue O, Fechter P, Haller A, Fabbretti A, Choulier L, Micura R, Klaholz BP, Romby P, et al. *Escherichia coli* ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol.* 2013;11:e1001731.
- Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma ME, Laumond G, Schmidt S, Decoville T, Proust A, Lambotin M, et al. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood.* 2012;120:3708–17.
- Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science.* 1990;250:1139–42.
- Hubner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK. Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol.* 2007;81:12596–607.
- Hogue IB, Hoppe A, Ono A. Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J Virol.* 2009;83:7322–36.

44. Fritz JV, Briant L, Mely Y, Bouaziz S, de Rocquigny H. HIV-1 viral protein R: from structure to function. *Future Virol.* 2010;5:607–25.
45. Darlix JL, de Rocquigny H, Mauffret O, Mely Y. Retrospective on the all-in-one retroviral nucleocapsid protein. *Virus Res.* 2014;193:2–15.
46. Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:5781–5.
47. Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:523–7.
48. Hamard-Peron E, Muriaux D. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology.* 2011;8:15.
49. Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, Martin MA. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol.* 1994;68:5311–20.
50. Derdowski A, Ding L, Spearman P. A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag–Gag interactions. *J Virol.* 2004;78:1230–42.
51. Larson DR, Ma YM, Vogt VM, Webb WW. Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J Cell Biol.* 2003;162:1233–44.
52. Liang C, Hu J, Whitney JB, Kleiman L, Wainberg MA. A structurally disordered region at the C terminus of capsid plays essential roles in multimerization and membrane binding of the gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2003;77:1772–83.
53. Ko JR, Wu JY, Kirby R, Li IF, Lin A. Mapping the essential structures of human ribosomal protein L7 for nuclear entry, ribosome assembly and function. *FEBS Lett.* 2006;580:3804–10.
54. Hemmerich P, von Mikecz A, Neumann F, Sozeri O, Wolff-Vorbeck G, Zobelein R, Krawinkel U. Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:223–31.
55. Behrmann E, Loerke J, Budkevich TV, Yamamoto K, Schmidt A, Penczek PA, Vos MR, Burger J, Mielke T, Scheerer P, Spahn CM. Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell.* 2015;161:845–57.
56. Boudier C, Storchak R, Sharma KK, Didier P, Follenius-Wund A, Muller S, Darlix JL, Mely Y. The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *J Mol Biol.* 2010;400:487–501.
57. Godet J, de Rocquigny H, Raja C, Glasser N, Fichoux D, Darlix JL, Mely Y. During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem. *J Mol Biol.* 2006;356:1180–92.
58. Sharma K, Didier P, Darlix JL, de Rocquigny H, Bensikaddour H, Lavergne JP, Penin F, Lessinger JM, Mely Y. Kinetic analysis of the nucleic acid chaperone activity of the hepatitis C virus core protein. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:3632–42.
59. Sleiman D, Bernacchi S, Xavier Guerrero S, Brachet F, Larue V, Paillart JC, Tisne C. Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein. Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA Biol.* 2014;11:906–20.
60. Vo MN, Barany G, Rouzina I, Musier-Forsyth K. HIV-1 nucleocapsid protein switches the pathway of transactivation response element RNA/DNA annealing from loop-loop “kissing” to “zipper”. *J Mol Biol.* 2009;386:789–801.
61. Bernacchi S, Mely Y. Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:E62.
62. Bernacchi S, Stoylov S, Piemont E, Fichoux D, Roques BP, Darlix JL, Mely Y. HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of TAR and its complementary sequence. *J Mol Biol.* 2002;317:385–99.
63. Azoulay J, Clamme JP, Darlix JL, Roques BP, Mely Y. Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *J Mol Biol.* 2003;326:691–700.
64. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Barsov E, Hood BL, Fisher RJ, et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol.* 2006;80:9039–52.
65. Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:5246–51.
66. Milev MP, Ravichandran M, Khan MF, Schriemer DC, Moulard AJ. Characterization of staufen1 ribonucleoproteins by mass spectrometry and biochemical analyses reveal the presence of diverse host proteins associated with human immunodeficiency virus type 1. *Front Microbiol.* 2012;3:367.
67. Chen J, Grunwald D, Sardo L, Galli A, Plisov S, Nikolaitchik OA, Chen D, Lockett S, Larson DR, Pathak VK, Hu WS. Cytoplasmic HIV-1 RNA is mainly transported by diffusion in the presence or absence of Gag protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E5205–13.
68. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:19114–9.
69. Molle D, Segura-Morales C, Camus G, Berlioz-Torrent C, Kijms J, Basyuk E, Bertrand E. Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *J Biol Chem.* 2009;284:19727–43.
70. Lehmann M, Milev MP, Abrahamyan L, Yao XJ, Pante N, Moulard AJ. Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and viral production are dependent on dynein motor function and late endosome positioning. *J Biol Chem.* 2009;284:14572–85.
71. Valiente-Echeverria F, Melnychuk L, Vyboh K, Ajamian L, Gallouzi IE, Bernard N, Moulard AJ. eEF2 and Ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP1) modulate stress granule assembly during HIV-1 infection. *Nat Commun.* 2014;5:4819.
72. Poole E, Strappe P, Mok HP, Hicks R, Lever AM. HIV-1 Gag–RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic.* 2005;6:741–55.
73. Kleiman L, Halwani R, Javanbakht H. The selective packaging and annealing of primer tRNA_{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res.* 2004;2:163–75.
74. Sonstegard TS, Hackett PB. Autogenous regulation of RNA translation and packaging by Rous sarcoma virus Pr76gag. *J Virol.* 1996;70:6642–52.
75. Cimarelli A, Luban J. Translation elongation factor 1- α interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol.* 1999;73:5388–401.
76. Anderson EC, Lever AM. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol.* 2006;80:10478–86.
77. Soto-Rifo R, Valiente-Echeverria F, Rubilar PS, Garcia-de-Gracia F, Ricci EP, Limousin T, Decimo D, Moulard AJ, Ohlmann T. HIV-2 genomic RNA accumulates in stress granules in the absence of active translation. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:12861–75.
78. Gietz RD, Schiestl RH. Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc.* 2007;2:1–4.
79. El Meshri SE, Dujardin D, Godet J, Richert L, Boudier C, Darlix JL, Didier P, Mely Y, de Rocquigny H. Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *J Mol Biol.* 2015;427:1480–94.
80. Anton H, Taha N, Boutant E, Richert L, Khatter H, Klaholz B, Ronde P, Real E, de Rocquigny H, Mely Y. Investigating the cellular distribution and interactions of HIV-1 nucleocapsid protein by quantitative fluorescence microscopy. *PLoS ONE.* 2015;10:e0116921.
81. Nara PL, Hatch WC, Dunlop NM, Robey WG, Arthur LO, Gonda MA, Fischinger PJ. Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1987;3:283–302.
82. Burrer R, Haessig-Einius S, Aubertin AM, Moog C. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology.* 2005;333:102–13.
83. Dieci G, Bottarelli L, Ballabeni A, Ottonello S. tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein Expr Purif.* 2000;18:346–54.
84. McKinstry WJ, Hijnen M, Tanwar HS, Sparrow LG, Nagarajan S, Pham ST, Mak J. Expression and purification of soluble recombinant full length HIV-1 Pr55 protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2014;100C:10–8.
85. Sharma KK, de Rocquigny H, Darlix JL, Lavergne JP, Penin F, Lessinger JM, Mely Y. Analysis of the RNA chaperone activity of the hepatitis C virus core protein on the conserved 3'X region of the viral genome. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:2540–53.

Article 2

p6 domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity

p6 domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity

K. K. Sharma¹, **H. Karnib**¹, C. Boudier¹, E. Boutant¹, H. de Rocquigny^{1*}, and Y. Mély^{1*}

¹Biophotonics and Pharmacology Laboratory, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

Introduction

La polyprotéine Gag du VIH-1 joue un rôle essentiel dans la sélection de l'ARN viral et dans l'assemblage du virus. Cette protéine est divisée en plusieurs domaines : matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC) et p6 ainsi que SP1 et SP2 localisés de part et d'autre de la NC. Cette dernière interagit avec les acides nucléiques (AN), permet la sélection et la dimérisation de l'ARN génomique et facilite la reverse transcription, alors que la p6 recrute différents facteurs cellulaires comme TSG101 de la famille ESCRT et ALIX afin de permettre le bourgeonnement de la particule.

Pour assurer ses fonctions, la NC possède une activité de chaperonne des acides nucléiques. Cette activité permet le réarrangement des acides nucléiques pour atteindre la structure thermodynamiquement la plus stable. Cette fonction d'activité chaperonne de la NC a été très bien décrite en utilisant la NC sous forme de peptide libre (55 acides aminés), tronquée (12-53 et 11-55) ou plus long (NCp7-SP2, NCp7-SP2-p6) (50,102,233). Il apparaît que le rôle des motifs dactyles serait important pour ouvrir et stabiliser des séquences compétentes pour l'hybridation alors que les domaines basiques neutralisent les charges phosphates afin de faciliter l'interaction entre les AN (50,230,241).

Inversement, l'activité chaperonne de Gag a été très peu décrite. Dans un test permettant de suivre l'hybridation *in vitro* entre ARN^{t_{Lys3}} et la séquence PBS du génome du VIH-1, le groupe de Kleiman (240,264) a montré que Gag possédait une faible activité de chaperonne et que cette activité était perdue avec la protéine Gag déléetée de la NC (247).

Dans cet article, nous avons cherché à caractériser le mécanisme de l'activité chaperonne de Gag en utilisant deux modèles très bien connus, qui sont l'hybridation de cTAR/dTAR et de PBS(+)/PBS(-) (233). Le couple cTAR/dTAR mime le premier saut de brin, au début de la reverse transcription alors que le couple PBS(+)/PBS(-) mime le deuxième saut de brin (281,282).

L'hybridation de ces deux systèmes est suivie en fonction du temps en présence de Gag et de GagΔp6. Cette protéine ne possède plus le domaine p6 mais a été utilisée par les groupes d'A Rein, de C. Muzier-Forsyth et de Williams pour suivre l'activité chaperonne de Gag (247,263,284). Nos travaux ont donc permis de déterminer que le domaine p6 a un effet sur l'activité chaperonne des acides nucléiques de Gag.

Résultats

Pour caractériser l'activité chaperonne de Gag et de GagΔp6, nous avons défini les conditions expérimentales où ces protéines n'agrègent pas les acides nucléiques. Cette étude est faite alors par la technique de FCS. Cette technique analyse la variation de l'intensité de fluorescence dans un volume réactionnel ce qui permet, notamment, de déterminer le nombre de particules fluorescentes qui diffuse dans le volume expérimental. Une agrégation va se traduire par une diminution du nombre de molécules fluorescentes qui diffusent.

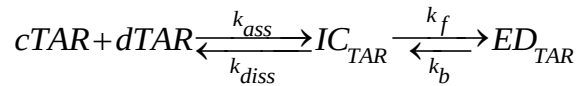
Pour déterminer ces conditions, 100 nM de cTAR-Rhodamine sont mélangés avec différentes concentrations de Gag ou de GagΔp6. On remarque dans la figure 2 de la publication que le nombre de molécules qui diffuse reste stable jusqu'à un ratio 1/1 puis diminue montrant une agrégation. Nous avons donc utilisé le rapport acide nucléique/protéine de 1/1 dans nos expériences.

Etudes du mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de Gag ou GagΔp6

Dans un premier temps, le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de Gag et de GagΔp6 est étudié en mélangeant un excès d'oligonucléotide non marqué dTAR à sa séquence complémentaire doublement marquée Rh6G-cTAR-Dabcyl (conditions pseudo premier ordre). La formation du complexe étendu de 55 pb induit un éloignement entre la rhodamine et la dabcyI ce qui permet une restauration de la fluorescence de la rhodamine. Les résultats, montrent une augmentation de fluorescence d'un facteur 13 et 11 en présence de Gag et GagΔp6 respectivement (table 1 de la publication). Ces courbes obtenues sont analysées en utilisant la loi de bi-exponentielle :

$$I(t) = I_f - (I_f - I_0) \left(a e^{(-k_{obs1}(t-t_0))} - (1-a) e^{(-k_{obs2}(t-t_0))} \right)$$

Ensuite, ces cinétiques ont été réalisées avec une quantité croissante de dTAR-Gag (ou dTAR-GagΔp6) et les constantes de réactions k_{obs1} , k_{obs2} reportées en fonction de la concentration de dTAR. Comme le montre les figures 2C et 2D de l'article 2, une variation linéaire de k_{obs1} et hyperbolique de k_{obs2} sont observées pour Gag et GagΔp6. Ces résultats indiquent la présence d'une réaction d'hybridation en deux étapes passant par un complexe intermédiaire (I.C.) qui sera transformé en complexe étendu (E.D.) selon la réaction suivante :



La formation de l'I.C. est gouvernée par les constantes d'association k_{ass} et de dissociation k_{diss} calculées par l'analyse selon la loi linéaire de $k_{obs1} = k_{ass} [dTAR] + k_{diss}$. Par contre, la variation hyperbolique de k_{obs2} indique que la transformation du complexe intermédiaire en complexe étendu est gouvernée par les constantes k_f et le k_b calculées selon la loi hyperbolique: $k_{obs} = (k_f \times K_M \times dt) / (1 + (K_M \times dt))$

Ces résultats (table 1 de l'article) montrent que les constantes k_{ass} et K_M obtenues pour GagΔp6 sont deux fois inférieures à celles calculées pour Gag. Cela souligne le rôle du domaine p6 qui accélère la formation de l'IC. De plus, les valeurs de k_f sont similaires pour les deux protéines, confirmant ainsi le rôle de p6 dans la première étape de la réaction d'hybridation de cTAR/dTAR (table 1 de l'article) et non pas dans la formation du complexe étendu.

Dans un deuxième temps, pour identifier les domaines nucléotidiques impliqués dans la voie d'hybridation, des mutants de cTAR et de dTAR ont été testés. La première séquence utilisée est la séquence dTAR-TL dont les bases situées dans la boucle ont été changées en T (figure 1 de la publication). Dans le cas de Gag, la réaction en présence du dTAR-TL est ralentie et les constantes k_{ass} , k_{diss} et k_f ont diminué d'un facteur 2 (table 1 dans l'article), tandis que, dans le cas de GagΔp6, aucun changement significatif n'est observé. Ce résultat suggère que le domaine p6 de Gag favorise les interactions boucle-boucle durant la réaction d'hybridation de cTAR/dTAR.

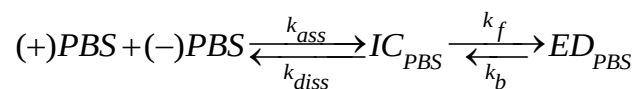
Pour voir l'effet des tiges dans la réaction d'hybridation, nous avons utilisé deux autres mutants de cTAR :

- 1- La séquence cTAR1.2 qui possède une tige 4 fois plus stable que cTAR (figure 1 de la publication). Dans ce cas, la réaction d'hybridation est devenue très lente et les constantes ont diminué d'un facteur 24 et 53 en présence de Gag et GagΔp6 respectivement.
- 2- La séquence 14-39cTAR ou mini-cTAR. Dans cet oligonucléotide, les tiges sont très courtes. On observe une diminution de la vitesse de réaction par rapport à cTAR/dTAR et les constantes ont diminué d'un facteur 6 et 14 en présence de Gag et GagΔp6 respectivement.

Tous ces résultats obtenus avec les oligonucléotides mutés permettent de suggérer que l'hybridation en présence de Gag se fait selon un mécanisme en deux étapes passant par les tiges et les boucles, tandis qu'en présence de GagΔp6 l'hybridation de cTAR/dTAR se fait selon un mécanisme en deux étapes mais en passant uniquement par les tiges. Cela montre que la présence de p6 favorise le passage par la voie boucle-boucle lors de la réaction d'hybridation.

Etudes du mécanisme d'hybridation de PBS(+)/PBS(-) en présence de Gag ou GagΔp6

Pour vérifier que ces deux protéines chaperonne les AN suivant différents mécanismes, nous avons utilisé un deuxième système basé sur l'hybridation de deux séquences complémentaires de 18 nucléotides nommées PBS(+) et PBS(-). En utilisant les conditions expérimentales décrites ci-dessus, nous avons démontré que l'hybridation PBS(+)/PBS(-) en présence de Gag est ≈ 3 fois plus rapide que celle obtenue avec GagΔp6, et que la variation des constantes reste la même dans le cas des deux protéines (linéaire pour k_{obs1} et hyperbolique pour k_{obs2}). Ces résultats obtenus avec PBS(+)/PBS(-) confirment ceux obtenus avec cTAR/dTAR à savoir que Gag est plus efficace que GagΔp6 et que le mécanisme d'hybridation passe en deux étapes:



De manière intéressante, la diminution d'un facteur de 2 à 3 des différentes constantes cinétiques k_{ass} et k_{diss} dans le cas de GagΔp6 souligne l'effet du domaine p6 dans la formation

du complexe intermédiaire. De manière intéressante, les résultats montrent que le k_f est 3 fois supérieur avec Gag comparativement à Gag Δ p6 ce qui montre que le domaine p6 de Gag joue un rôle essentiel dans la cinétique de formation du complexe intermédiaire et étendu PBS(+)/PBS(-).

Parallèlement, nous avons utilisé des mutants de PBS afin de déterminer le mécanisme d'hybridation de PBS(+)/PBS(-) (figure 1 de l'article).

- 1- Le premier mutant utilisé est le A₅(-) PBS. Ce mutant possède 5 résidus A dans la boucle empêchant les interactions boucle-boucle. Quand la réaction PBS(+)/A₅(-)PBS est effectuée en présence de Gag, une diminution de la vitesse de réaction et des constantes cinétiques (k_{ass} et K_M) sont observées. Par contre, aucun changement significatif n'est observé dans le cas de Gag Δ p6. Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment avec cTAR/dTAR à savoir le rôle du domaine p6 de Gag dans la stimulation d'une interaction boucle-boucle lors de la réaction d'hybridation.
- 2- Le deuxième mutant est la séquence T₄(-) PBS dans lequel la séquence ¹⁵GCCA¹⁸ est remplacée par 4 T (figure 1 de l'article). Dans ce cas, nous inhibons les interactions par les extrémités protrudentes. Les résultats montrent une diminution d'un facteur 7 de la vitesse d'hybridation du PBS(+)/T₄(-) PBS avec Gag Δ p6 tandis qu'aucun changement de la vitesse réactionnelle n'est observée avec Gag.

L'importance des boucles dans le mécanisme dépendant de Gag a été assise par une autre approche. Nous avons utilisé une séquence PBS contenant dans la boucle en position 6 ou 8 une base amino purine (AP). Dans un mélange réactionnel contenant 1 μ M de 6AP(-)PBS ou 8AP(-)PBS et un équivalent de Gag, nous avons observé une augmentation de 1.6 fois du signal de fluorescence de l'AP. Cette augmentation traduit clairement la déstabilisation de la boucle de PBS en présence de Gag. En conclusion, tous ces résultats montrent qu'en présence de Gag, PBS(+)/PBS(-) s'hybride essentiellement via les boucles selon un mécanisme en deux étapes alors qu'en absence de p6, PBS(+)/PBS(-) s'hybride via les tiges.

Discussion

L'activité de chaperonne des acides nucléiques de la NCp7 mature est bien connu (219,228-234) mais celui de la NC en tant que domaine de Gag reste à décrire. De plus, les seuls

travaux sur l'activité chaperonne de Gag ont été effectués avec la protéine GagΔp6 (229,244,247,263,284) mais sans la comparer avec la protéine sauvage. Pour étudier l'activité chaperonne de Gag, nous avons donc utilisé deux tests développés au laboratoire et comparé la protéine Gag avec la protéine GagΔp6. Dans cet article, nous proposons un mécanisme expliquant la propriété de chaperonne de la protéine Gag et soulignons pour la première fois, le rôle de la p6 dans ce mécanisme.

Dans ce travail, nous montrons que Gag et GagΔp6 accélèrent l'hybridation de cTAR et PBS. Dans les deux tests, la présence du domaine p6 dans Gag permet d'augmenter la vitesse de réaction par un facteur ≈ 3 . Cette augmentation de vitesse ne peut pas être reliée à l'ouverture des tiges car Gag ne déstabilise pas ou très peu cTAR et PBS (résultat non montré). Il semble donc que cette accélération de la vitesse soit due à la possibilité pour Gag de passer par les tiges et par les boucles (présence de deux complexes intermédiaires) alors que la GagΔp6 ne passe que par les tiges (un seul complexe intermédiaire). De plus, la diminution de la vitesse d'hybridation observée avec GagΔp6 peut être corrélée à la diminution du pouvoir de neutralisation des charges négatives des acides nucléiques suite à l'absence du domaine p6.

Pour confirmer que la présence du domaine p6 favorise une interaction boucle-boucle dans le test cTAR/dTAR, nous avons utilisé le test PBS et montré que la protéine sauvage passait exclusivement par les boucles. De manière intéressante, le groupe de Musier-Forsyth a démontré, en utilisant la NCp15, NCp9 et NCp7, que l'interaction avec les acides nucléiques pourrait être régulée par le domaine p6. En effet, dans leur test, la NCp15 est la moins efficace ce que les auteurs expliquent par un rapprochement dans l'espace de la NCp7 et du p6 notamment au niveau des motifs dactyles de la NCp7 (102). Ces résultats traduiraient un double rôle du domaine p6 avec le recrutement des partenaires cellulaires pour faciliter le bourgeonnement viral et son effet sur l'activité chaperonne de Gag.

Ces résultats obtenus avec Gag ont été comparés à ceux obtenus avec la NCp7 mature. Celle-ci hybride cTAR/dTAR selon un mécanisme similaire à Gag, en deux étapes passant par les tiges et les boucles. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous montrons qu'une molécule de Gag hybride cTAR à dTAR avec une vitesse similaire à 4 molécules de NCp7. Il semble donc que dans ce système Gag soit plus efficace que la NCp7. Cette

meilleure efficacité pourrait être liée au nombre de charges de Gag car Gag possède 64 résidus basiques (Lys, Arg) et la NCp7 18 seulement. Dans le test PBS nous montrons ici, dans les mêmes conditions expérimentales, qu'une molécule de Gag hybride PBS(+)/PBS(-) avec une vitesse similaire à une molécule de NCp7. Cela suggère que dans le système PBS Gag hybride ces deux séquences avec une efficacité similaire à la NCp7.

p6 domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity

K. K. Sharma¹, H. Karnib¹, E. Boutant¹, C. Boudier¹, H. de Rocquigny^{1*}, and Y. Mély^{1*}

¹ Biophotonics and Pharmacology Laboratory, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

* Corresponding Author contact: yves.mely@unistra.fr, Tel: (+33) 368854263; fax (+33)368854312

Abstract

HIV-1 Gag is a multi-domain protein that orchestrates the highly coordinated process of virion assembly through its different domains: matrix (MA) at N-terminus, capsid (CA), nucleocapsid (NC) and late domain (p6) at C-terminus. Gag is thought to chaperone tRNA^{Lys3} placement onto the genomic RNA primer binding site (PBS) and RNA dimerization, by virtue of nucleic acid chaperone (NAC) activity. The NAC activity is mainly mediated by its NC domain; still the timing and possible regulation of this activity remain elusive. In addition, the contribution of the p6 domain of Gag to its NAC activity is also unclear. Here, we monitored the effect of p6 domain on Gag's NAC activity and mechanism using two annealing systems. Primarily, we demonstrated the molecular aspects behind Gag's NA chaperoning of 55 nt and 18 nt long complementary DNA stem-loop sequences of the HIV-1 transactivation response element TAR and PBS, respectively, and later on the effect of p6 domain. Our results showed that Gag, with or without p6 domain, annealed both TAR and PBS systems through a two-step kinetic pathway, with the formation of a fast pre-equilibrium intermediate that slowly converts into the final extended duplex. Our results showed that the p6 domain is responsible for a two-fold increase in overall Gag's annealing activity and plays a key role in the selection of Gag-mediated annealing pathway by contributing annealing reaction via loops of oligonucleotide sequences, besides the customary pathway going through complementary stems.

Keywords: HIV-1 Gag, Nucleic acid chaperone, HIV-1 GagΔp6, cTAR/dTAR annealing, PBS annealing

Introduction

The human immunodeficiency type 1 (HIV-1) Gag polyprotein precursor (herein after named as “Gag” in the article) plays a critical role in the assembly of HIV-1 virion, virus-like particles (VLPs) and in the selection of the genomic RNA (gRNA) (Swanstrom and Wills 1997; Ganser-Pornillos, Yeager et al. 2008; Sundquist and Krausslich 2012). This 55-kDa multidomain protein consists of the matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), and p6 or ‘late’ domains (D'Souza and Summers 2005; Anderson and Lever 2006; Rein, Datta et al. 2011). Each domain contributes to the overall activity of Gag: (i) the MA domain targets Gag to the plasma membrane during virus assembly and also binds RNA Chukkapalli et al., 2010; Shkriabai et al., 2006; Jones et al 2011 and for a review (Vlach and Saad 2015)), (ii) the CA domain facilitates Gag multimerization through CA-CA interaction (Schur, Hagen et al. 2014) and for a review (Ganser-Pornillos, Yeager et al. 2012), (iii) the NC domain is required for genomic RNA packaging, primer placement (Darlix, de Rocquigny et al. 2014) ; Levin et al., 2005; (Rein 2010)), viral RNA dimerization (Darlix, Gabus et al. 1990; Liang, Edelsbrunner et al. 1998), and integration of proviral DNA into the host genome (Carteau et al., 1999; Thomas et al., 2006) and (iv) the p6 domain facilitates the budding of viral particles through recruitment of TSG101 and ALIX of ESCRT family. (Adamson and Freed, 2007)(Sundquist and Krausslich 2012; Prescher, Baumgartel et al. 2015).

NC's function in virus replication is mainly correlated with its nucleic acid binding and chaperone activity (NAC) that directs nucleic acids into their most thermodynamically stable conformations (Tsuchihashi and Brown, 1994; reviewed in Levin et al., 2005; Rajkowitsch et al., 2007; Rein et al., 1998; Godet et al 2010). During or shortly after budding, Gag is cleaved by the viral protease and mature NC protein is released. Since, tRNA^{Lys3} annealing to the PBS also occurs in viruses that lack active protease (Cen et al., 1999, 2000; Feng et al., 1999; Huang et al., 1997; Kleiman and Cen, 2004), this strongly suggests that Gag may act as an NAC (Huang Y et al., 1997). The NAC activity of Gag during tRNA^{Lys3} annealing has been demonstrated *in vitro* by using purified recombinant HIV-1 Gag (Gao F et al., 2009; Jones CP et al., 2011; Kaye JF et al., 1998). Moreover, only Gag and partially processed Gag proteins containing the NC domain show NAC activity (Tiyun Wu et al., 2010), indicating the critical role of the NC domain as part of Gag. However, the NAC activity harbored by Gag is low (Cen, Khorchid et al. 2000; Wu, Datta et al. 2010 ; Xing, Liang et al. 2011; Rye-McCurdy, Nadaraia-Hoke et al. 2014), suggesting that Gag requires co-factors to favor its NAC activity (Xing, Liang et al. 2011; Mekdad, Boutant et al. 2016).

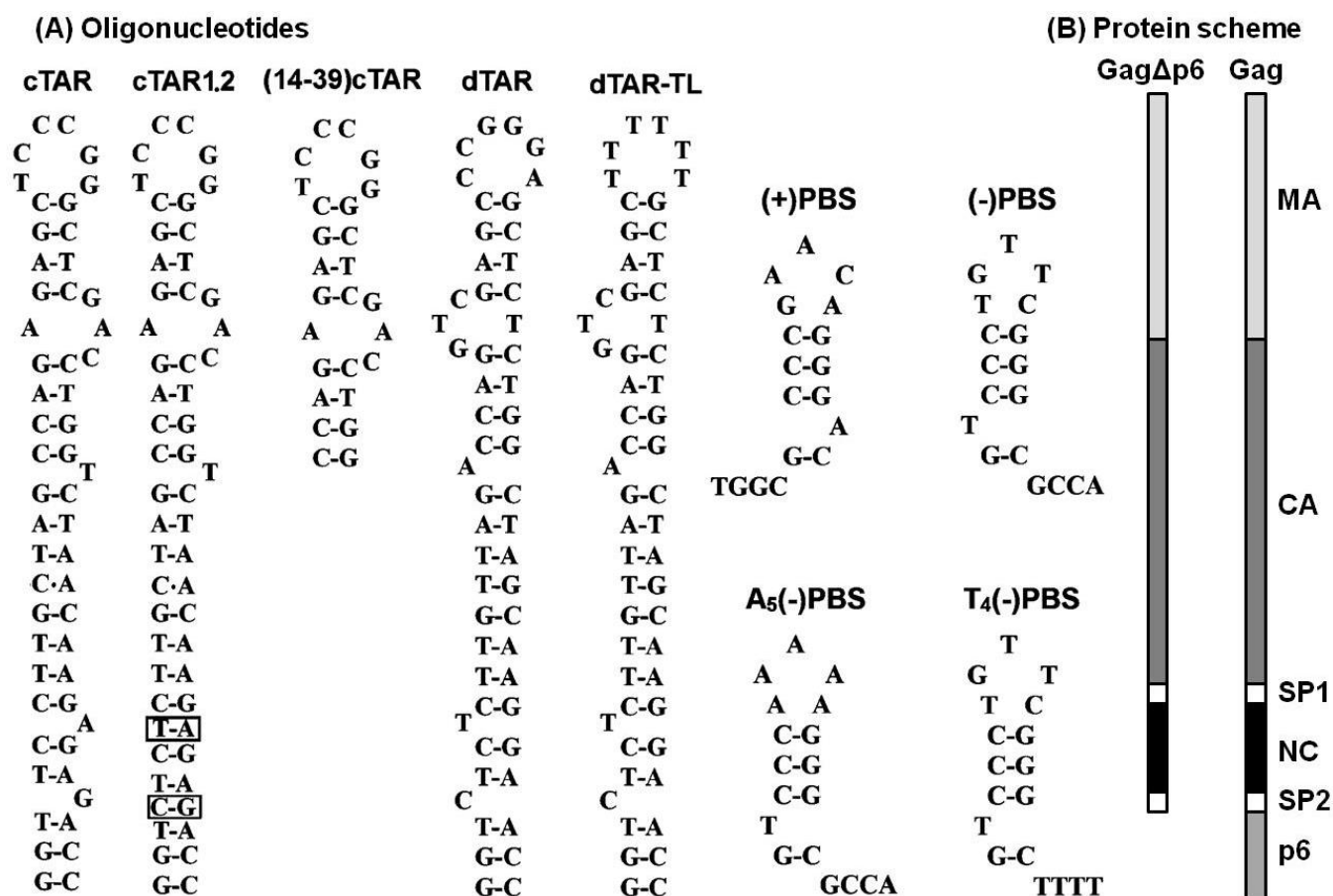


Figure 1: Oligonucleotides and protein used in the study. (A) The oligonucleotide sequences are from the HIV-1 MAL strain. The secondary structures of the oligonucleotides were predicted from the structure of TAR (Baudin F et al., 1993) and the mfold program (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>). (B) Schematic representation of WT and mutant HIV-1 Gag proteins.

In this article, we characterized in depth the NAC activity of full length Gag using two well established annealing systems, namely cTAR/dTAR and (+)PBS/(-)PBS (Godet et al., 2006; Egele et al, 2004; Ramalanjaona N et al., 2007, Godet et al, 2011, 2013, Kamal, 2010). In the first system, we used two 55 nt stem-loop oligonucleotides corresponding to dTAR, the DNA form of the HIV-1 transactivation response and its complementary sequence cTAR DNA (Figure 1A). In the second system, we used the DNA form of the 18nt long (+)PBS (primer binding site) stem-loop and its (-)PBS complement (Figure 1A). In addition to the NAC activity of Gag, we also comparatively characterized on the same systems the NAC activity of GagΔp6, a mutant of Gag devoid of p6 domain, in order to understand the role of the p6 domain in the NAC activity of Gag (Figure 1B). Our results indicated that both Gag and GagΔp6 do not lead to a fraying of cTAR and PBS secondary structures, but efficiently promote cTAR/dTAR and (+)/(-)PBS annealing. For cTAR/dTAR annealing, the p6 domain favored a contribution of the loops that was absent with GagΔp6. The effect was more pronounced for the (+)/(-)PBS system, where

the p6 domain was observed to shift the annealing reaction from a pathway through the PBS overhangs to a loop-loop pathway, due to destabilization of PBS loop.

Materials and Methods

Oligonucleotides. The unlabelled and labelled ODNs were synthesized by IBA GmbH Nucleic Acids product Supply (Gottingen, Germany). For singly labelled ODNs, the 5' terminus was labelled with TMR. In the case of the doubly labelled ODNs, the 5' terminus was labelled with ethyl 2-[3-(ethylamino)-6-ethylimino-2,7-dimethylxanthen-9-yl]benzoate hydrochloride (Rh6G) via an amino-linker with a six carbon spacer arm, while the 3' terminus was labelled with 4-(4'-dimethylaminophenylazo) benzoic acid (Dabcyl) using a special solid support with the dye already attached. A 2'-deoxyribosyl-2-aminopurine (2-Ap) was selectively introduced at positions 6 and 8 within (-)PBS loop, substituting the corresponding natural base. ODNs were purified by the manufacturer by reverse-phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis.

Protein expression and purification: Gag and Gag Δ p6 were expressed in BL21 (DE3) pLysis cells in LB (Luria-Bertani) medium (1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, and 0.5% NaCl). Recombinant protein production was performed by inoculating a single colony in 50 mL LB containing antibiotics. The bacteria were then cultured at 37°C, overnight with shaking. The overnight culture was used to inoculate 1 L LB containing antibiotics. The culture was grown at 37°C until an absorbance at 595 nm of 0.7 was reached. Expression of both proteins was induced by addition of 0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 18°C for 16 hours. Bacteria were harvested and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Gag and Gag Δ p6 were purified using Nickel or phosphocellulose affinity chromatography as described previously by the groups of Johnson Mak (McKinstry et al., 2014) and Alan Rein (Datta et al., 2007; Datta and Rein et al., 2009), respectively and their purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis (Supplementary Figure S1). Their concentrations were measured from their absorbance at 280 nm using $\epsilon_{\text{Gag}} = 63000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{\text{Gag}\Delta\text{p6}} = 59000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Note that both proteins are not myristoylated at their N-terminus (Campbell and Rein 1999 and McKinstry WJ et al., 2014).

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS). FCS measurements were performed on a two-photon platform including an Olympus IX70 inverted microscope, as described previously (Azoulay J et al., 2003; Clamme JP et al., 2003). Two-photon excitation at 850 nm is provided by an InSight DeepSee laser source (Spectra Physics, USA). The experiments were performed in an eight-well lab-Tek II coverglass system, using a 200- μL volume per well. The focal spot was set about 20 μm above the coverslip. Proteins were added to the labelled cTAR sequences at different nucleotide to peptide ratios. To avoid high local concentrations during mixing, both reactants were of the same volume. Assuming

that proteins diffuse freely in a Gaussian excitation volume, the normalized autocorrelation function, $G(\tau)$, calculated from the fluorescence fluctuations was fitted according to (Thompson N.L et al., 1991):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1/2} \quad (1)$$

Where τ_d is the diffusion time, N is the mean number of molecules within the excitation volume and S is the ratio between the axial and lateral radii of the excitation volume. The point spread function of the set-up was determined from a z-scan on one fluorescent bead (20 nm in diameter). The measured lateral and axial resolutions were respectively 0.3 and 1 μm . Data recording times were 10 min. Hundred autocorrelation curves were recorded for each sample. When spikes of high fluorescence intensity, most likely associated to aggregates, were observed in the fluorescence fluctuation profiles, the corresponding autocorrelation curves were discarded. In these conditions, the average autocorrelation curve calculated from the sum of the remaining autocorrelation curves could be adequately fitted by a single population model with a diffusion time close to that of cTAR alone.

Steady-state fluorescence spectroscopy and kinetic measurements: Emission spectra and kinetic traces were recorded with Fluorolog and FluoroMax spectrofluorimeters (Horiba, Jobin Yvon Instruments) equipped with a temperature-controlled cell compartment. All fluorescence intensities were corrected for buffer emission and lamp fluctuations. Real-time kinetic measurements were performed in pseudo first-order conditions by using concentrations of unlabelled TAR and (-)PBS derivatives at least 10-fold higher than the concentration of the labelled cTAR and (+)PBS sequences, respectively. Excitation and emission wavelengths were 520 nm and 550 nm, respectively, to monitor the Rh6G fluorescence. All reported concentrations correspond to those after mixing. To avoid high local concentrations during mixing, both reactant mixtures were prepared at the same volume. Proteins were added to each reactant separately at a protein to ODN ratio of 1:1 for both (+)/(-)PBS and cTAR/dTAR systems, and then the reaction was initiated by mixing the protein-coated ODNs together. The kinetics was fast enough to monitor the fluorescence intensities continuously without photo-bleaching. The apparent rate constants k_{obs} and the amplitudes were determined from the kinetic traces by including a dead-time correction t_0 to take into account the delay between the mixing of reactants and the start of the measurements. All fitting procedures were carried out with the OriginTM 8.1 software based on non-linear, least-square methods and the Levenberg-Marquardt algorithm. Experiments were performed in 50 mM Hepes-HCl (pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 1 mM MgCl_2 at 20°C.

Results

Defining non-aggregation conditions by Fluorescence Correlation Spectroscopy

In order to characterize in depth the NAC properties of the Gag and Gag Δ p6, we first determined the experimental conditions in which the protein did not cause DNA aggregation (Cristofari and Darlix 2002; Egele, Piemont et al. 2007; Stoylov 2007). Such aggregation can cause strong bias when using fluorescence-based techniques (Godet, de Rocquigny et al. 2006; Egele, Piemont et al. 2007). To this end, we investigated the aggregation of TMR-labeled 5'-cTAR molecules by Gag or Gag Δ p6 molecules by means of fluorescence correlation spectroscopy (FCS). In this technique, the fluorescence intensity fluctuations are measured with time in the very small volume (about 0.2 fL) provided by a two photon excitation. These fluctuations are mainly governed by the diffusion of the fluorescent species throughout this excitation volume. They are then converted into a correlation function to obtain parameters such as the average number of fluorescent species within this volume and their diffusion constant. Aggregation is thus expected to decrease the number of fluorescent species.

Using a 100 nM TMR-5'-cTAR ODN concentration, we found that in the absence of proteins, the number of fluorescent cTAR molecules in the excitation volume was fully consistent with the theoretical number of molecules expected from their calculated concentration. By adding increasing concentrations of either protein, we found no change in the number of fluorescent species up to a protein/ODN ratio of 1:1, indicating that no aggregation occurred under these conditions (Figure 2A). In contrast, higher ratios (1.5:1, 2:1 and 5:1) induced a sharp drop in the number of fluorescent species indicating the formation of aggregates (Figure 2A). As a consequence, we selected a protein/ODN ratio of 1:1 for characterizing the chaperone properties of the two proteins.

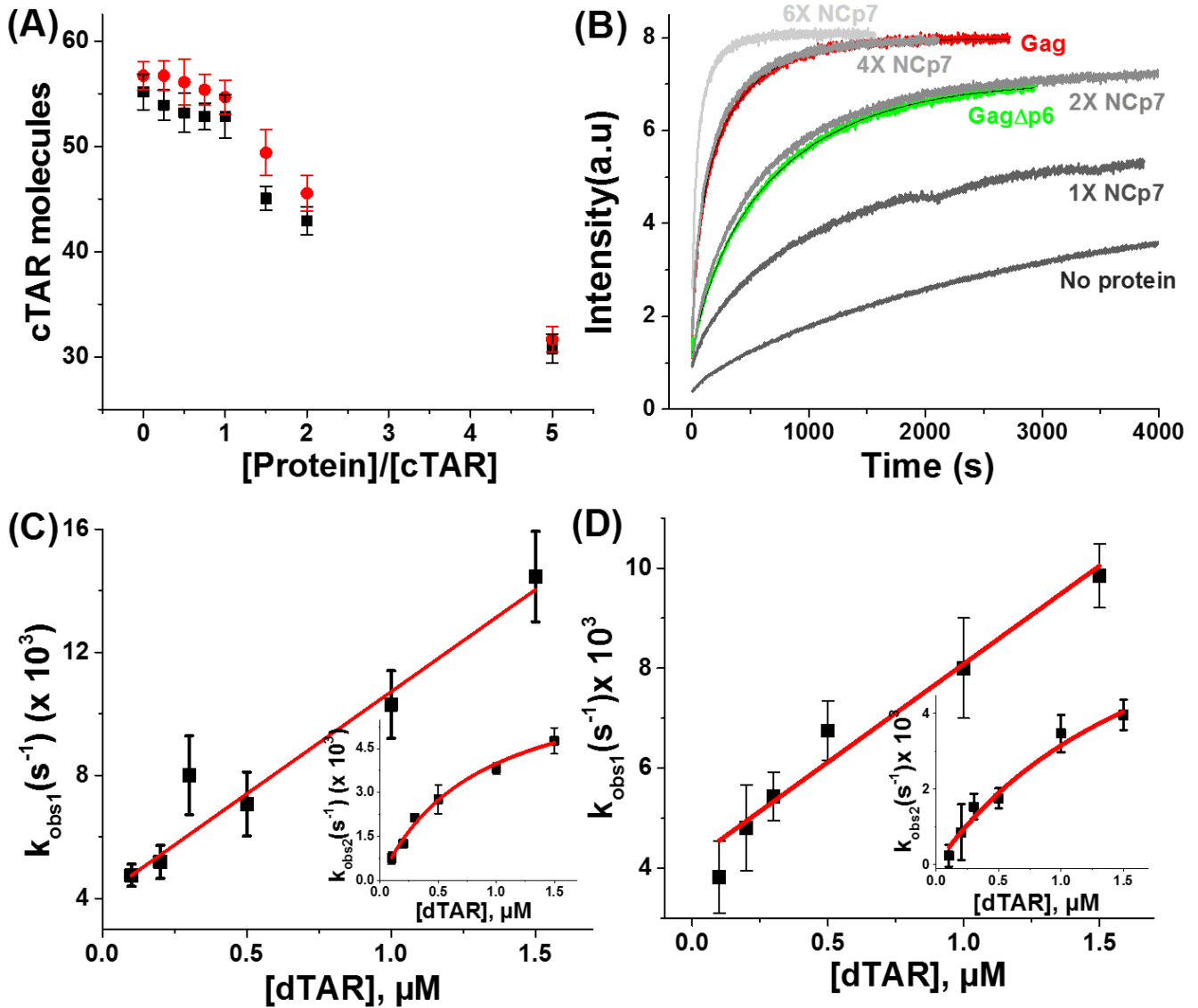


Figure 2: Gag- and GagΔp6-promoted cTAR/cTAR annealing. (A) Evidence of Gag- (red disks) and GagΔp6-induced (black squares) aggregation of TMR-5'-cTAR by Fluorescence Correlation Spectroscopy. The average number of fluorescent species, N , for 100 nM of TMR-5'-cTAR within the excitation volume was obtained by fitting the autocorrelation curves to Eq. 1. (B) Kinetics of cTAR/dTAR annealing in the presence of Gag (red trace), GagΔp6 (green trace) and NCp7 (grey traces). Kinetic trace of 10 nM doubly labelled cTAR reacted with 500 nM dTAR in the absence (no protein trace) and in the presence of Gag (red trace), GagΔp6 (green trace) added at a protein/ODN ratio of 1:1, and in presence of NCp7 (grey traces) added at a protein/ODN ratio of 1:1 (1X NCp7 trace), 2:1 (2X NCp7 trace), 4:1 (4X NCp7 trace) and 6:1 (6X NCp7 trace). Data curves were fitted according to equation (2) and parameters for Gag and GagΔp6 are provided in Table 1, while for NCp7 are provided in Table SI (Supplementary data). **Kinetic parameters of cTAR/dTAR annealing in the presence of (C) Gag or (D) GagΔp6.** The fast (k_{obs1}) and slow (k_{obs2}) (Insets) components for cTAR/dTAR annealing were determined in pseudo-first-order conditions from real-time kinetics, as described in Figure 2B. The red lines correspond to the fit of the experimental data with Equations (3) and (4), using the values given in Table 1. Experiments were performed in 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT at 20°C. Excitation and emission wavelengths were 520 and 555 nm, respectively, to monitor the TMR emission.

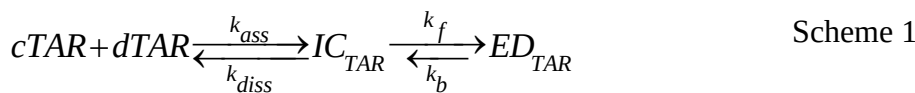
Kinetics of cTAR/dTAR annealing in the presence of Gag and GagΔp6

The real-time annealing kinetics of cTAR with its complementary dTAR sequences in presence of Gag or GagΔp6 were investigated by mixing excess of non-labelled dTAR to doubly labelled Rh6G-cTAR-Dabcyl. Formation of the 55-bp extended duplex (ED) strongly increases the interchromophore distance, leading to full recovery of Rh6G emission (Bernacchi and Mely 2001). An increase of 13 (± 1)- and 11 (± 1)-fold was observed for cTAR/dTAR in presence of Gag and GagΔp6, respectively, between the fluorescence intensities of the initial stem-loop and the final stretched ED (Figure 2B). The annealing kinetics traces could be adequately fitted using a bi-exponential function:

$$I(t) = I_f - (I_f - I_0) \left(a e^{(-k_{obs1}(t-t_0))} - (1-a) e^{(-k_{obs2}(t-t_0))} \right) \quad (2)$$

where $I(t)$ is the actual fluorescence intensity at 555 nm, k_{obs1} and k_{obs2} are the apparent pseudo-first order rate constants, a is the relative amplitude of the fast component, and t_0 is the dead time. I_0 and I_f stands for the fluorescence intensities of Rh6G-cTAR-Dabcyl in its free stem-loop state and in the final ED, respectively.

We observed that, for both Gag and GagΔp6, the fast component, k_{obs1} , varies linearly with dTAR concentrations (Figure 2C and 2D), while k_{obs2} shows a hyperbolic dependence on the complementary sequence concentration (Figure 2C and 2D, insets). This behaviour is consistent with a two-step reaction, as described in scheme 1:



Where a fast pre-equilibrium intermediate, IC_{TAR} , precedes the formation of the final stable ED_{TAR} through a monomolecular reaction (Vo MN, Barany G et al. 2009). The IC_{TAR} formation is governed by the second order association rate constant, k_{ass} , and the first order dissociation rate constant, k_{diss} , while its interconversion into ED_{TAR} is governed by the forward and backward interconversion rate constants, k_f and k_b , respectively.

The linear variation of k_{obs1} can be described by equation 3:

$$k_{obs1} = k_{ass} [dTAR] + k_{diss} \quad (3)$$

Furthermore, the hyperbolic dependence of k_{obs2} on the concentration of non-labeled dTAR can be associated to IC_{TAR} accumulation as a consequence of its, rate-limiting, slow inter-conversion into ED ($k_{ass} \cdot [dTAR] + k_{diss} \gg k_f$) and can be described by equation 4:

$$k_{obs2} = (k_f \times K_M \times dt) / (1 + (K_M \times dt)) \quad (4)$$

Where K_M is the equilibrium association constant governing the IC formation ($K_M = k_{ass}/k_{diss}$) and k_b is the reverse interconversion kinetic rate (from ED to IC formation).

Values of $8.7(\pm 0.7) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $4.1(\pm 1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ were determined for the association (k_{ass}) and dissociation (k_{diss}) constants, respectively (Table 1). Moreover, a $1.2(\pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ value was obtained for K_M , in good agreement with the $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ value calculated from the k_{ass}/k_{diss} ratio. Finally, a value of $4.8(\pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ was obtained for the sum of the forward (k_f) and backward (k_b) interconversion rate constants associated to the two kinetic components. The value of k_b , given by the intercept, was very low ($< 0.0001 \text{ s}^{-1}$), indicating that a stable ED is formed, and that the $4.8(\pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ value mainly corresponds to k_f . This conclusion is in line with the large expected differences in stability between the ED_{TAR} and the IC_{TAR} . Interestingly, the delayed kinetic trace observed with $Gag\Delta p6$ as compared to Gag (Figure 2B) results from a ~ 2 -folds decrease in both k_{ass} and K_M values for cTAR/dTAR annealing (Table 1), indicating that the p6 domain in Gag promotes and stabilizes the intermediate complex. In contrast, the similar k_f values for both Gag and $Gag\Delta p6$ proteins suggest a marginal role of the p6 domain in the interconversion of IC_{TAR} to ED_{TAR} .

Since, HIV-1 nucleocapsid protein, NCp7, also promote cTAR/dTAR annealing and is a well-known NA chaperone (Vo et al., 2009, Godet J et al., 2006; Liu HW et al., 2005, Barany G et al., 2009; Cosa G et al., 2006), we compared Gag and $Gag\Delta p6$ annealing efficiencies to NCp7 (Figure 2B). Comparison of Gag and $Gag\Delta p6$ with NCp7 at several molar ratios revealed that each molecule of Gag and $Gag\Delta p6$ provided the same annealing activity as that of 4 and 2 NCp7 molecules, respectively (Figure 2B). This suggests that one Gag molecule exhibits nearly the same chaperone activity as 4 molecules of NCp7, while $Gag\Delta p6$ exhibits as to that of 2 NCp7 molecules. These results further suggest that p6 domain is probably responsible for higher annealing activity of Gag protein.

Furthermore, to check the validity of the postulated two-step annealing mechanism, we further used the Dynafit numerical resolution software (Kuzmic P 1996), which allows fitting simultaneously the experimental progress curves obtained at different dTAR concentrations. The best estimates of the elementary rate constants k_{ass} , k_{diss} and k_f (Table SII, supplementary data) were in excellent agreement with those found by the empirical approach (Table 1), further strengthening the proposed reaction scheme.

Effects of cTAR and dTAR sequence and stability on their Gag- and GagΔp6-promoted annealing kinetics

We further investigated the impact of the cTAR and dTAR sequence and stability on their Gag- and GagΔp6-promoted annealing reactions. First, dTAR was substituted by the dTAR-TL mutant where the 6 nucleotides of the loop were changed to T residues (Figure 1) to prevent base-pairing with the cTAR loop. We observed a delay in the fluorescence time trace (Figure 3A, red trace) associated to a ~2-fold decrease in the k_{ass} , K_M and k_f values (Table 1) as compared to cTAR/dTAR annealing (Figure 3A, grey trace), when the reaction was performed in the presence of Gag. In contrast, no significant change in the progress curve (Figure 3B, compare red and grey traces) or in its associated rate constants (Table 1) was observed when dTAR was replaced by the dTAR-TL mutant in the annealing reaction promoted by GagΔp6. This indicated that loop-loop interactions play a significant role only in the Gag-promoted cTAR/dTAR annealing reaction

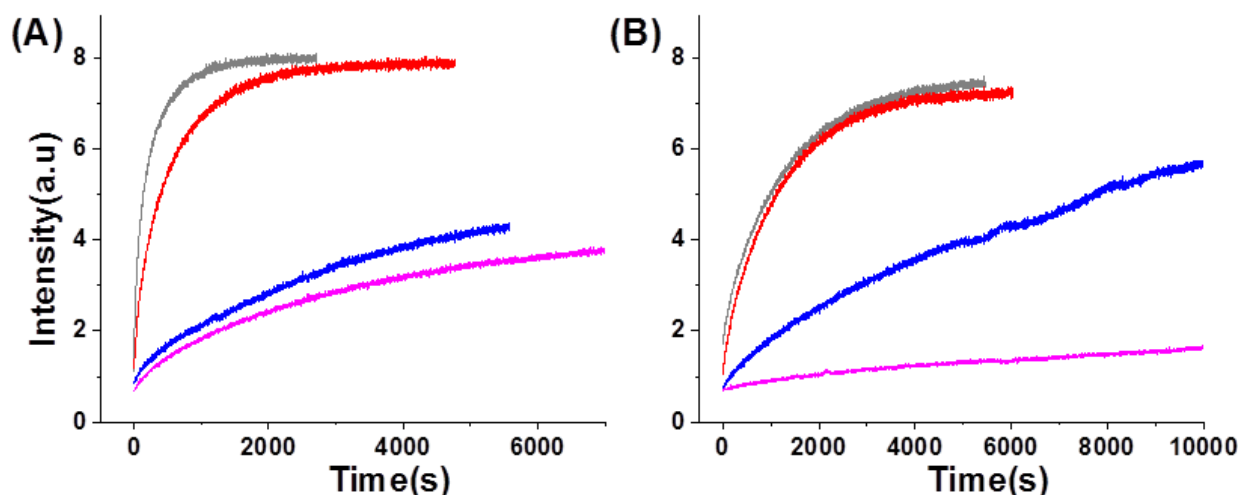


Figure 3: Effect of cTAR and dTAR sequence and stability on their annealing kinetics promoted by Gag (A) or GagΔp6 (B). Kinetic traces of 10 nM doubly labeled cTAR derivatives with 500 nM nonlabeled dTAR derivatives [cTAR/dTAR (grey), cTAR/dTAR-TL (red), cTAR1.2/dTAR (magenta) and (14-39)cTAR/dTAR (blue)]. All traces were fitted with Equation (2) and the parameters in Table 1. Both Gag and GagΔp6 were added at a protein/ODN ratio of 1:1 in all the cases. Experimental conditions were as in Figure 2. Excitation and emission wavelengths were 520 and 555 nm, respectively, to monitor the Rh6G emission.

Furthermore, the role of the cTAR stems was investigated by using cTAR1.2 and 14-39cTAR mutants. The cTAR1.2 mutant was previously shown to be about four times more stable than cTAR (Beltz H et al., 2003) due to the introduction of complementary bases (at positions 49 and 52) to the bulged bases, stabilizing the lower half of the cTAR stem (Figure 1). On the other hand, a stability similar to the cTAR 1.2 one was also observed for 14-39cTAR, also called mini-cTAR (Vo MN, Barany G et al., 2009; Beltz H et al., 2004), due to removal of the less-stable part of the cTAR stem (Figure 1). An

extremely slow annealing of cTAR1.2 to dTAR associated with a monoexponential fluorescence increase was observed in presence of both Gag (Figure 3A, magenta) and GagΔp6 (Figure 3B magenta). It was observed that such retarded reaction for cTAR1.2/dTAR annealing in presence of Gag and GagΔp6 was due to 24- and 53-fold decrease in their forward interconversion rates (k_f), respectively (Table 1), when compared to cTAR/dTAR annealing. Meanwhile, the annealing of 14-39cTAR to dTAR showed that the values of interconversion rates (k_f s) for 14-39cTAR/dTAR annealing in presence of Gag (Figure 3A, blue) and GagΔp6 (Figure 3B, blue) were decreased by 6- and 14-folds, respectively, compared to cTAR/dTAR annealing. Due to experimental limitations, it was not possible to acquire k_{ass} and k_{diss} parameters using analytical approach thus, those parameters were acquired using dyna fit (Table 1). Empirical approach showed a ~2-fold decrease in k_{ass} values (besides interconversion rates, k_{fs}) for both cTAR1.2/dTAR annealing and 14-39cTAR/dTAR annealing when compared to cTAR/dTAR annealing, in presence of Gag and GagΔp6, respectively. The results evidenced that, similar to NCp7 at saturating concentrations (Godet J et al., 2006; Liu HW et al., 2005; Vo MN, Barany G et al., 2009; Cosa G et al., 2006), both Gag and GagΔp6 nucleate cTAR/dTAR annealing through the cTAR and dTAR stems. However, the higher dependence of GagΔp6 on nucleation through ODNs stem ends is clearly evidenced by the 2-fold decrease in k_f value for both cTAR1.2/dTAR and 14-39cTAR/dTAR annealing reactions as compared to that of corresponding reaction in presence of Gag (Table 1).

Taken together, our data indicate that the Gag-promoted cTAR/dTAR annealing reaction is nucleated through the stems but with considerable contribution of the loops, while GagΔp6-promoted annealing reaction seems to be nucleated only through zippering of the complementary ODN stems.

Kinetics of (+)PBS/(-)PBS annealing in the presence of Gag and GagΔp6

To further characterize the NAC mechanisms of Gag and GagΔp6, and clarify the role of the p6 domain, we monitored the Gag- or GagΔp6-promoted annealing kinetics of (+)PBS with its complementary (-)PBS sequence. Formation of the 18-bp extended duplex (ED) increases the interchromophore distance, leading to full restoration of Rh6G fluorescence, both in the presence of Gag (Figure 4A, red trace) and GagΔp6 (Figure 4A, green trace).

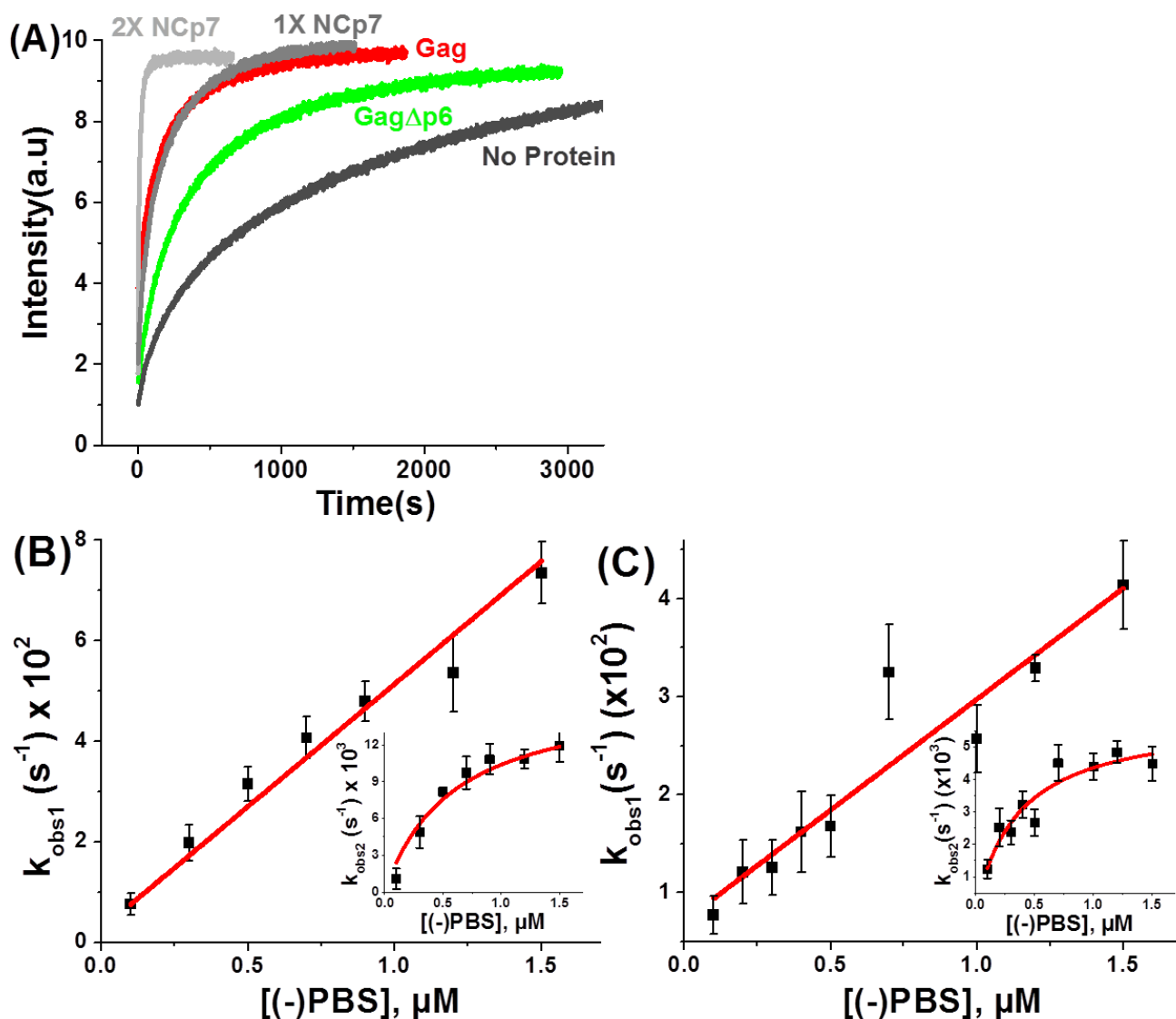
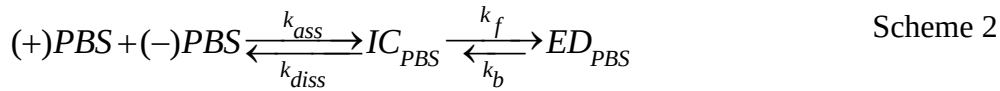


Figure 4: Gag- and GagΔp6-promoted (+)/(-)PBS annealing kinetics. (A) Kinetic traces of (+)/(-)PBS annealing in the presence of Gag (red), GagΔp6 (green) and NCp7 (grey traces). Kinetic trace of 10 nM doubly labelled (+)PBS reacted with 500 nM (-)PBS in the absence (no protein trace) and in the presence of Gag (red trace), GagΔp6 (green trace) added at a protein/ODN ratio of 1:1, and in presence of NCp7 (grey traces) added at a protein/ODN ratio of 1:1 (1X NCp7 trace) and 2:1 (2X NCp7 trace). Data curves were fitted according to equation (2) and parameters for Gag and GagΔp6 are provided in Table 1, while for NCp7 are provided in Table SIII (Supplementary data). **Kinetic parameters of (+)/(-)PBS annealing in the presence of (B) Gag and (C) GagΔp6.** The fast (k_{obs1}) (B and C) and slow (k_{obs2}) (Insets B and C) components for the (+)/(-)PBS annealing reaction were determined from progress curves in pseudo-first-order conditions, as described in (A). The red lines correspond to the fits of the experimental data with Equations (3) and (4), using the values given in Table 1. Experiments were performed in 50 mM HEPES (pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT at 20°C. Excitation and emission wavelengths were 520 and 555 nm, respectively, to monitor the Rh6G emission.

By fitting the annealing kinetic traces with biexponential equation (1), a linear and hyperbolic dependency on (+)PBS concentration were observed for k_{obs1} and k_{obs2} , respectively, when (+)PBS/(-)PBS annealing reactions were performed in the presence of either Gag (Figure 4B and 4B inset) or GagΔp6 (Figure 4C and 4C inset). By analogy to cTAR/dTAR annealing, such behaviour is consistent with the abovementioned two-step reaction:



Interestingly, a delayed progress curve was observed with GagΔp6 as compared to Gag (Figure 4A), as a result of a ~2-folds and ~3-folds decrease in the k_{ass} and k_f values, respectively (Table 1). This indicates that the p6 domain favors the formation of both the IC_{PBS} and ED_{PBS} . Although both Gag and GagΔp6 accelerates the (+)PBS/(-)PBS annealing (comparing red trace and green trace with no protein trace in Figure 4A), still their comparison with NCp7 at different molar ratios revealed that both proteins (Gag and GagΔp6) are less efficient in annealing PBS complementary sequences. Comparison of 1 molecule of Gag with NCp7 at different molar ratios revealed that 1 molecule of Gag provided the same (+)PBS/(-)PBS annealing activity as that of 1 NCp7 molecules (Figure 4A). This lowering of chaperone activity of Gag/GagΔp6 molecules, compared to cTAR/dTAR annealing, could probably be attributed to the ability of Gag to rearrange the PBS loop and to restrict the dynamics of the PBS loop bases, similar to NCp7 (Bourbigot et al., 2008 ; Godet et al., 2011). Again, the validity of the postulated two-step annealing mechanism was checked by using the Dynafit numerical resolution software (Kuzumi P 1996) and the best estimates of the elementary rate constants k_{ass} , k_{diss} and k_f (Table SB, supplementary data) were in excellent agreement with those found by the empirical approach (Table 1), further strengthening the proposed reaction scheme 2.

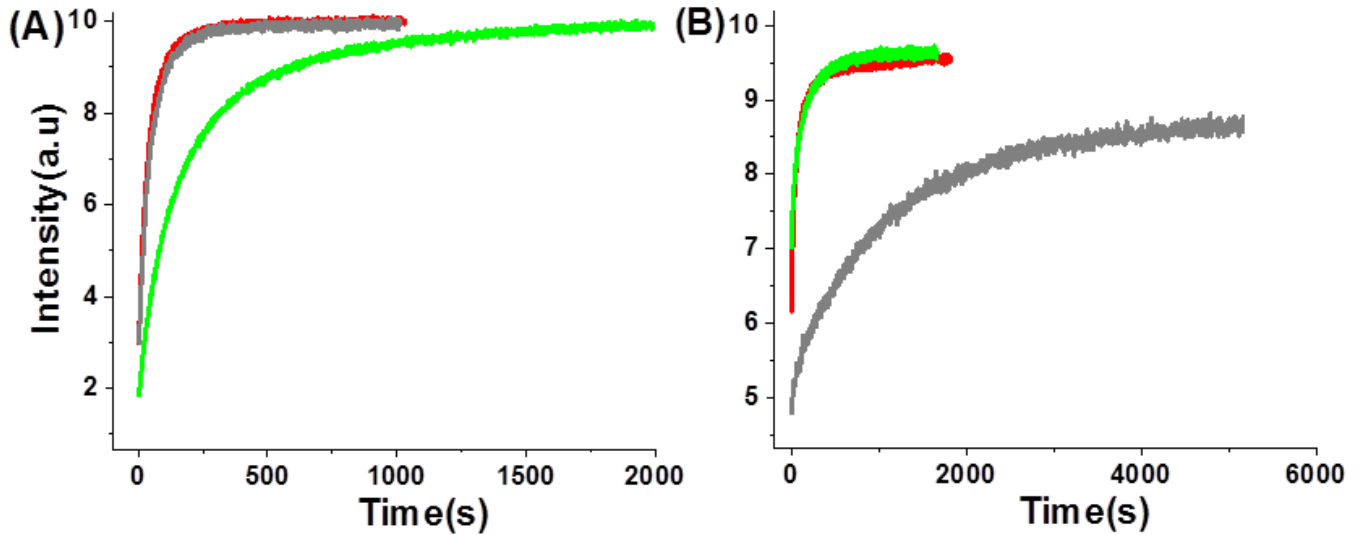


Figure 5: Effect of (-)PBS sequence on its annealing kinetics with (+)PBS promoted by Gag (A) or GagΔp6 (B). Kinetic traces were obtained by reacting 10 nM doubly labeled (+)PBS with 500 nM nonlabeled (-)PBS derivatives [(+)PBS/(-)PBS (red), (+)PBS/T₄(-)PBS (grey) and (+)PBS/A₅(-)PBS (green)]. All traces were fitted with Equation (2) and the parameters in Table 1. Both Gag and GagΔp6 proteins were added at a protein/ODN ratio of 1:1 and experimental conditions were as in Figure 4.

Dependence of the Gag- and GagΔp6- promoted (+)PBS/(-)PBS annealing kinetics on the (-)PBS sequence

To investigate the impact of the (-)PBS loop and overhang on the Gag or GagΔp6-promoted (+)PBS/(-)PBS annealing reaction, we performed the annealing reaction with two (-)PBS mutants, namely A₅(-)PBS and T₄(-)PBS. In the A₅(-)PBS mutant, the five nucleotides of the loop were changed to A residues (Figure 1) in order to prevent base-pairing with the (+)PBS loop. When the (+)PBS/A₅(-)PBS annealing reaction was performed in the presence of Gag, we observed a delayed fluorescence time trace as compared to (+)PBS/(-)PBS (Figure 5A, compare green and red traces) associated with a 2- to 3-fold decrease in the values of k_{ass} and K_M (Table 1). In sharp contrast, mutation of the loop did not significantly affect the progress curve (Figure 5B, compare green and red traces) and the kinetic parameters (Table 1) of the GagΔp6-promoted annealing reaction. These results suggest that the p6 domain promotes the contribution of the PBS loops in the (+)PBS/(-)PBS annealing pathway.

Next, we used the T₄(-)PBS mutant to examine the role of the (-)PBS single-stranded overhang in the Gag and GagΔp6-promoted annealing reaction. In this mutant, the ₁₅GCCA₁₈ overhang sequence was substituted by a T4 sequence that cannot anneal with the (+)PBS protruding sequence (Figure 1). A dramatically delayed fluorescence time trace as compared to (+)PBS/(-)PBS (Figure 5B, compare grey and red traces) was observed in the presence of GagΔp6. This delay results from a ~7-fold decrease in the values of k_{ass} and K_M (Table 1), indicating that the overhangs are critical in the GagΔp6-promoted

formation of the intermediate complex. In sharp contrast, no significant delay in the progress curves (Figure 5A, compare grey and red traces) and no significant change in the kinetic parameters (Table 1) was observed when (-)PBS was replaced by T₄(-)PBS in the Gag-promoted annealing reaction. This indicates that in contrast to GagΔp6, the PBS overhangs play only a marginal role in the nucleation of the Gag-promoted (+)/(-)PBS annealing reaction.

Taken together, our (+)PBS/(-)PBS annealing data strongly suggest that (+)PBS/(-)PBS annealing is mainly nucleated through a loop-loop pathway in the presence of Gag, while the GagΔp6-promoted annealing reaction seems to be nucleated through the single strand overhangs. Thus, the p6 domain seems to play a key role in the selection of annealing pathway.

Gag destabilizes the loop region of (-)PBS sequence

Further, site-selective interactions of Gag and its comparison with NCp7, with (-)PBS sequence, were characterized by using ODN labelled by 2-Ap, a fluorescence analogue of adenine, highly sensitive to the environment. To this end, we substituted T residues at position 6 (6Ap (-)PBS) and at position 8 (8Ap (-)PBS) in (-)PBS loop by 2-Ap (Figure 6A inset).

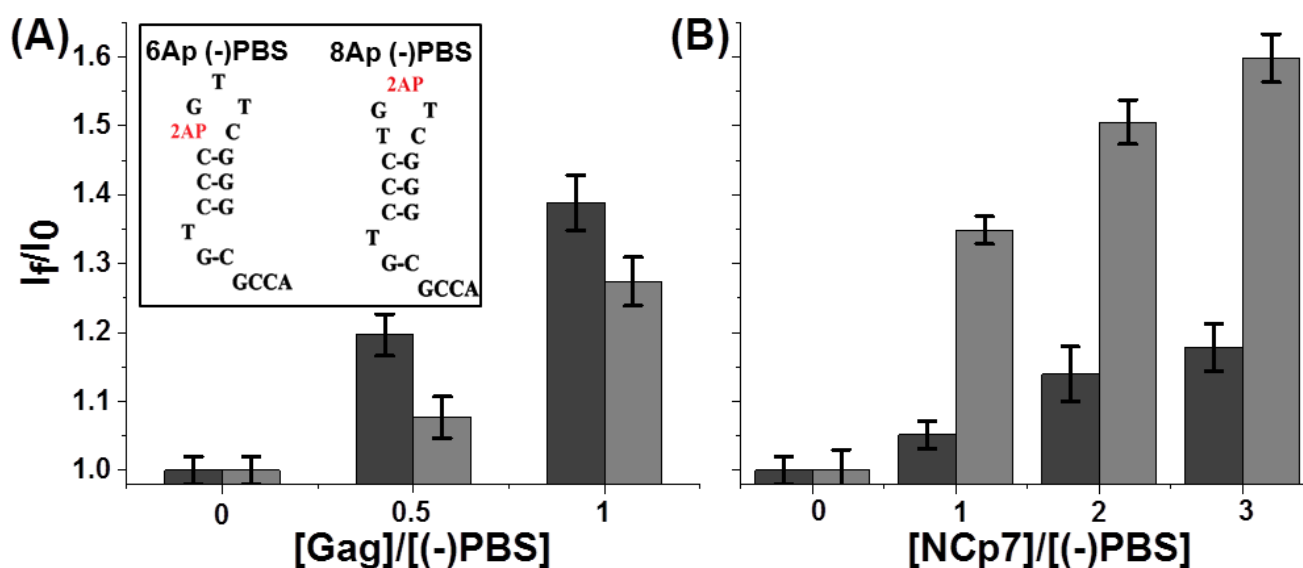


Figure 6: Evidence of Gag's interaction in loop region of (-)PBS by site-selective labeling. Ratios of 2-Ap fluorescence intensities at the emission wavelength of 370 nm for 1 μM 6Ap (-)PBS (Inset 6A and grey bars) and 1 μM 8Ap (-)PBS (Inset 6A and light grey bars) in presence of (A) Gag at protein to ODN ratio of 0:1, 0.5:1 and 1:1, and in presence (B) NCp7 at protein to ODN ratio of 0:1, 1:1, 2:1 and 3:1, respectively. All spectra were collected at excitation wavelength of 315 nm and were corrected for buffer emission.

Comparison of the 2Ap fluorescence intensity ratios in the absence and in the presence of Gag clearly evidenced that Gag significantly rearranged the PBS loop (Figure 6A), like NCp7 (Bourbigot et al., 2008; Godet et al., 2011). Comparing 2Ap fluorescence intensity ratios at 6th (at the base of PBS loop) and 8th (at the apex of PBS loop) nucleotide position, higher rearrangements are observed at position 6 (1.2- and 1.4-folds at 0.5X Gag and 1X Gag, respectively) as to that of position 8 (1.07- and 1.25-folds at 0.5X Gag and 1X Gag, respectively) (Figure 6A), suggesting that Gag probably interacts simultaneously with both the base and the apex of PBS loop. On the other hand, NCp7 showed higher 2Ap fluorescence ratios for position 8 (Figure 6B, comparing grey bars with light grey bars), suggesting that NCp7 destabilizes mainly the apex region of PBS loop. Furthermore, comparison of 1 molecule of Gag with NCp7 at different molar ratios revealed that 1 molecule of Gag provided the similar destabilization activity (~1.4-folds at 1X Gag), both at base and apex of PBS loop, as that of 1 NCp7 molecules, at apex of PBS loop (Figure 6A and 6B). Analogy to NCp7, it can be predicted that this local structural rearrangement of the loop depends on the integrity of the zinc finger hydrophobic platform (Avilov, Piemont et al. 2008; Avilov, Godet et al. 2009; Godet, Ramalanjaona et al. 2011). Thus, similar to NCp7, the destabilizing activity of Gag is directly responsible for the switch to the loop-loop annealing pathway.

Discussion

The interactions of Gag protein with nucleic acids are remarkably diverse, including (i) a nonspecific interaction which is essential for assembly into virus particles; (ii) a specific interaction by which the genomic RNA of the virus is selectively packaged into the nascent virus particle; and (iii) a nonspecific interaction in which nucleic acids are rearranged into the thermodynamically most favorable conformation via virtue of its NAC activity (Campbell and Vogt 1995; Fisher, Rein et al. 1998; Campbell and Rein 1999; Cimarelli, Sandin et al. 2000; Cruceanu, Urbaneja et al. 2006). There is undisputed role of NC domain in Gag towards Gag's chaperone functions (Cen et al., 2000; Feng et al., 1999; Guo et al., 2009; Chan et al., 1999; Roldan et al., 2005; Hargittai et al., 2001; Iwatani et al., 2007; Levin et al., 2005); still the role of other domains towards NAC activity, remain elusive.

In this work, for the first time, we investigated the NAC activity of Gag in presence and absence of p6 domain, by characterizing the annealing mechanisms of extensivity studies cTAR/dTAR (Roda, Balakrishnan et al. 2002; Godet, de Rocquigny et al. 2006; Egele, Piemont et al. 2007; Stewart-Maynard, Cruceanu et al. 2008; Vo, Barany et al. 2009; Sharma, Didier et al. 2010) and (+)PBS/(-)PBS (Godet J et al., 2011; Ramalanjaona N et al., 2007; Johnson PE et al., 2000; Bourbigot S et al., 2008) stem-loop sequences. The promotion of both cTAR/dTAR and (+)/(-)PBS annealing by Gag, in absence of p6 domain, was found to start from cTAR/(+)PBS ends and to proceed through a two-step kinetic

pathway that included a fast pre-equilibrium intermediate and a rate limiting conversion into their respective final ED (Figure 7A and 7B). On the other hand, Gag with p6 domain, favored a contribution of the TAR loops that was absent in absence of p6 domain (Figure 7A). The contribution of loops is strongly favored in case of PBS annealing, where the presence of p6 domain was observed to shift the annealing reaction from a pathway through the PBS overhangs to a loop-loop pathway (Figure 7B).

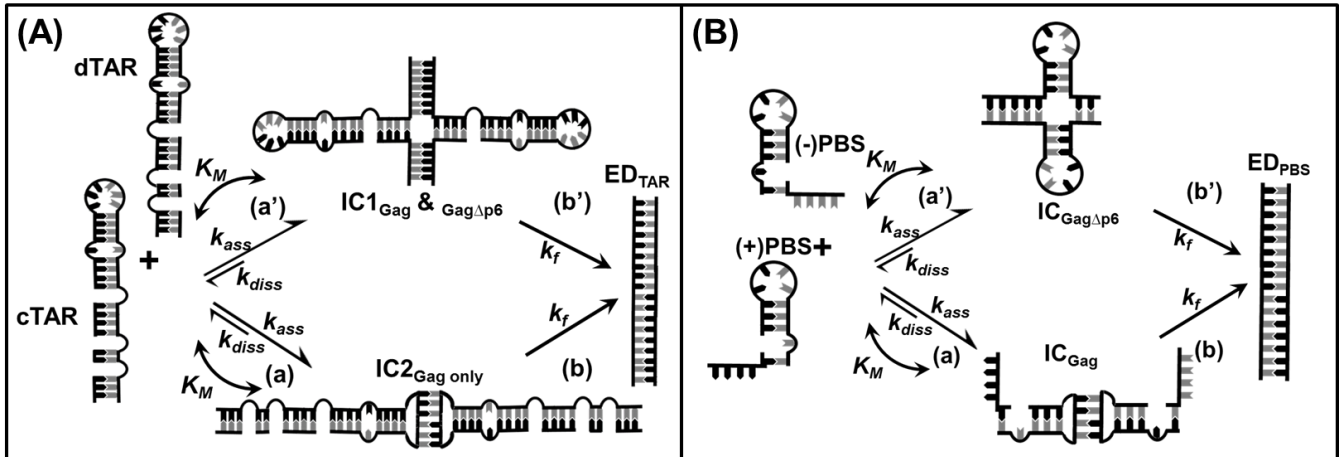


Figure 7: Proposed mechanism for the (A) cTAR/dTAR and (B) (+)PBS/(-)PBS annealing reactions. With GagΔp6, both cTAR/dTAR and (+)PBS/(-)PBS annealing reactions are thought to involve a two steps reaction pathway. The pathways, depicted as upper pathway (Panel A and B: (a'-b')), are thought to be nucleated through stem termini interactions, passing through an accumulation of intermediate complexes formed due to hybridization between cTAR-dTAR stems (Panel A: IC1) or overhangs of PBS sequences (Panel B: IC_{GagΔp6}). While, in presence of Gag protein, in addition to stem-stem interactive pathway (Panel A: IC1), cTAR/dTAR annealing reaction also goes through loop-loop interactive pathway (Panel A: (a-b)) that passes through an additional intermediate complex formation (Panel A: IC2_{Gag only}). On the other hand, Gag-mediated (+)PBS/(-)PBS annealing shifted to the pathway that goes through mainly loop-loop interactions (Panel B: (a-b)), going through intermediate complex formation (Panel B: IC_{Gag}).

Furthermore, kinetic parameters showed that the presence of p6 domain can augment the overall annealing ability of Gag by at least 2-folds. HIV-1 NC have also been shown to anneal both cTAR/dTAR and (+)PBS/(-)PBS sequences through stem-stem and loop-loop intermediate pathways (Godet, de Rocquigny et al. 2006; Vo, Barany et al. 2009). Comparing with literature on TAR sequence hybridization, it was observed that one Gag molecule exhibits the same chaperone activity as 4 to 6 NCp7 molecules, since the K_M values of the IC for TAR sequences with Gag (about 10^6 M^{-1}) is similar to the corresponding K_M value obtained with NCp7 added at a ratio of 4 to 6 proteins per ODN (Vo, Barany et al. 2009). Our results confirmed that one Gag molecule, in presence and absence of p6 domain is similar to the annealing activities harbored by 4 and 2 molecules of NCp7, respectively. This is also evidenced by the 2-fold increase in kinetic parameters for Gag-driven-PBS annealing as compared to that of NC(11-55)-driven-PBS annealing (Ramalanjaona, de Rocquigny et al. 2007) as ~ 3 molecules of NCp7 are needed to fully coat PBS sequence. However, such effect was not observed with

full length NCp7, since both Gag and NCp7 probably occupy similar binding site in PBS loop. In addition, NCp7 and both Gag proteins (Gag and Gag Δ p6) likely differ on how they promote the interconversion reaction. For cTAR/TAR, the interconversion rate constant, in the absence of any peptide is about $1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, while it is about 3-fold higher in the presence of NCp7, at any protein/oligonucleotide ratio (Godet J et al., 2006). The corresponding values for both Gag proteins are at least one order of magnitude higher than in the absence of protein, thus suggesting strong inclination of Gag proteins towards the interconversion reaction. Moreover, in contrast to native NCp7 (Godet, de Rocquigny et al. 2006; Vo, Barany et al. 2009) which requires high peptide/ODN ratios for optimal activity, the Gag proteins showed NAC activity at low protein/ODN ratios.

This enhancement of TAR and PBS sequence annealing and destabilization of PBS loop indicated probable role of p6 domain in helping the NC domain of Gag to position properly in order to allow Gag for exerting its specific NAC activity. In turn, this proper positioning of NC domain due to presence of p6 domain may results in mechanistic shift that allows the annealing going through the loop region. In this context, Wang et al, 2014 demonstrated using NCp15 that the distinct NA interaction mode of NCp15 is regulated by the acidic p6 domain due to a fold-back conformation (Wang, Naiyer et al. 2014), existing due to electrostatic interaction between NC's Zinc Fingers and p6 domain. The weakening of this fold-back conformation results in larger aggregates upon NA binding. Since, higher aggregation propensity is directly related to higher NAC activity; it may be probable that this fold-back conformation is advantageous to NAC activity of Gag. Thus, the possibilities of dual function for the existence of p6 domain cannot be excluded, where its presence in fold-back conformation lead to an elevated annealing activity of Gag. While, disruption of this fold-back conformation lead to Gag's interaction with other interacting partners. These properties of Gag protein may be critical for genomic RNA dimerization in HIV-1 replication and RNA packaging, as well as for facilitating recombination between various HIV genotypes and subtypes to increase viral variability.

Table 1: Kinetic parameter of (+)PBS/(-)PBS and cTAR/dTAR annealing and their respective mutants in absence and presence of Wt Gag and GagΔp6

labeled	Comp			$k_{\text{ass}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$					
Oligo	Oligo	Protein	Ratio	a	³	$k_{\text{diss}} (\text{s}^{-1}) \times 10^3$	$K_{\text{M}} (\text{M}^{-1}) \times 10^{-5}$	$k_f (\text{s}^{-1}) \times 10^3$	If/I0
cTAR	dTAR	Gag	1	0.68 (±0.1)	8.7 (±0.7)	4.1 (±1)	12 (±2)	4.8 (±0.6)	13 (±1)
cTAR	dTAR-TL	Gag	1	0.65 (±0.07)	2.9 (±0.3)	3 (±0.3)	7.6 (±2)	1.8 (±0.05)	12 (±1)
cTAR1.2	dTAR	Gag	1		3.7 ^a	4 ^a	8.2 (±2)	0.2 (±0.02), 0.18 ^a	12 (±1)
14-39cTAR	dTAR	Gag	1		4.7 ^a	3 ^a	3.7 (±1)	0.8 (±0.04), 0.65 ^a	11 (±1)
cTAR	dTAR	GagΔp6	1	0.54 (±0.05)	3.9 (±0.4)	4.2 (±0.4)	5.1 (±2)	5.3 (±1)	11 (±1)
cTAR	dTAR-TL	GagΔp6	1	0.5 (±0.04)	4.1 (±0.5)	4 (±0.3)	5.8 (±3)	3.1 (±1)	10 (±1)
cTAR1.2	dTAR	GagΔp6	1		2.2 ^a	5 ^a	5.2 (±5)	0.1 (±0.03), 0.12 ^a	9 (±1)
14-39cTAR	dTAR	GagΔp6	1		2.7 ^a	4 ^a	3.9 (±0.7)	0.4 (±0.04), 0.35 ^a	10 (±1)
(+)PBS	(-)PBS	Gag	1	0.78 (±0.06)	49 (±4)	3 (±1)	17 (±5)	16.5 (±3)	28 (±2)
(+)PBS	A ₅ (-)PBS	Gag	1	0.48 (±0.06)	25 (±2)	2.5 (±1)	6.5 (±1.4)	12.5 (±2)	27 (±2)
(+)PBS	T ₄ (-) PBS	Gag	1	0.8 (±0.07)	55 (±5)	4 (±3)	13 (±4)	28.5 (±6)	14 (±2)
(+)PBS	(-)PBS	GagΔp6	1	0.74 (±0.06)	23 (±3)	7 (±2)	27 (±8)	6 (±0.7)	30 (±1)
(+)PBS	A ₅ (-)PBS	GagΔp6	1	0.76 (±0.07)	28 (±3)	11 (±2)	33 (±7)	7 (±0.8)	29 (±2)
(+)PBS	T ₄ (-) PBS	GagΔp6	1	0.38 (±0.06)	3.3 (±0.5)	6 (±1)	3.6 (±1)	8.1 (±3.1)	14 (±2)

^a values were acquired by empirical approach using dyna fit.

p6 domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity

K. K. Sharma¹, H. Karnib¹, E. Boutant¹, C. Boudier¹, H. de Rocquigny¹, and Y. Mély^{1*}

¹ Biophotonics and Pharmacology Laboratory, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

* Corresponding Author contact: yves.mely@unistra.fr, Tel: (+33) 368854263; fax (+33)368854312

Supplementary Material

Table SI: The kinetic rate constant values obtained from the annealing experiments with 10 nM doubly labelled cTAR and 500 nM non-labelled dTAR at different protein to oligonucleotide ratio of NCp7.

[cTAR], nM	[dTAR], nM	[NCp7]/ [cTAR+dTAR]	<i>a</i>	$k_{obs1} (\times 10^3)$ s^{-1}	$k_{obs2} (\times 10^3)$ s^{-1}
10	500	0	0.1 (± 0.01)	2.5 (± 0.4)	0.3 (± 0.03)
10	500	1	0.34 (± 0.01)	2.8 (± 0.5)	0.6 (± 0.1)
10	500	2	0.38 (± 0.03)	5.2 (± 0.6)	1.1 (± 0.07)
10	500	4	0.51 (± 0.02)	9.4 (± 0.3)	2.7 (± 0.06)
10	500	6	0.63 (± 0.05)	33.1 (± 0.8)	6.5 (± 0.07)

Table SII: Comparison of the kinetic rate constant values obtained from the analytical approach and the numerical approach for a two-step reaction mechanism

	Parameters	Analytical approach	Numerical approach
cTAR/dTAR	$K_{ass} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-3}$	8.7	8.1
annealing in presence	$K_{diss} (s^{-1}) \times 10^3$	4.1	3.7
of Gag	$k_f (s^{-1}) \times 10^3$	4.8	4.2
cTAR/dTAR	$K_{ass} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-3}$	3.9	3.9
annealing in presence	$K_{diss} (s^{-1}) \times 10^3$	4.2	3.8
of GagΔp6	$k_f (s^{-1}) \times 10^3$	5.3	3.9
(+)PBS/(-)PBS+Gag	$K_{ass} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-3}$	49	40
annealing in presence	$K_{diss} (s^{-1}) \times 10^3$	3	2.2
of Gag	$k_f (s^{-1}) \times 10^3$	16.5	13
(+)PBS/(-)PBS	$K_{ass} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-3}$	23	24
annealing in presence	$K_{diss} (s^{-1}) \times 10^3$	7	4
of GagΔp6	$k_f (s^{-1}) \times 10^3$	6	3.8

The values from the analytical approach were from Table 1. The Dynafit numerical resolution software (Kuzmic P. et al., 1996) was used to simultaneously fit the experimental progress curves obtained at different complementary sequence concentrations. Standard deviations for the values obtained from Dynafit simulations were lower than 2% in all cases. The two-step reaction mechanism for cTAR/dTAR and (+)PBS/(-)PBS annealing described respectively, in schemes 1 and 2 was validated by the similarities in the values of the kinetic rate constants obtained by both methods.

Table SIII: The kinetic rate constant values obtained from the annealing experiments with 10 nM doubly labelled (+)PBS and 500 nM non-labelled (-)PBS at different protein to oligonucleotide ratio of NCp7.

[(+) PBS], nM	[(-) PBS], nM	[NCp7]/[PBS]	<i>a</i>	$k_{obs1} (\times 10^2) \text{ s}^{-1}$	$k_{obs2} (\times 10^3) \text{ s}^{-1}$
10	500	0	0.66 (± 0.07)	0.7 (± 0.1)	1.4 (± 0.2)
10	500	1	0.52 (± 0.06)	3.4 (± 0.2)	9 (± 0.8)
10	500	2	0.95 (± 0.07)	5.5 (± 0.2)	9 (± 1)

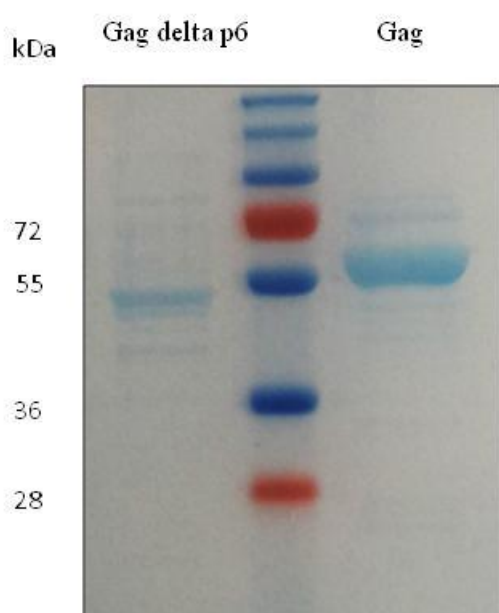


Figure S1: Gel analysis of purified Gag and GagΔp6 used in this study. The proteins were analyzed on a 12% SDS-polyacrylamide gel. The amounts of protein loaded on the gel were as follows: Gag, 3 μg and GagΔp6, 1 μg. Molecular markers were run on the same gel to verify the molecular mass of the HIV-1 proteins and the positions of the markers are shown to the left of the gel image. For each of the test proteins, the residue numbers in Gag and the respective molecular mass values were as follows: Gag (1-550, 55.6 kDa) and GagΔp6 (1-447, 50.0 kDa).

References:

- Anderson, E. C. and A. M. Lever (2006). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation." *J Virol* 80(21): 10478-10486.
- Avilov, S. V., J. Godet, et al. (2009). "Site-specific characterization of HIV-1 nucleocapsid protein binding to oligonucleotides with two binding sites." *Biochemistry* 48(11): 2422-2430.
- Avilov, S. V., E. Piemont, et al. (2008). "Probing dynamics of HIV-1 nucleocapsid protein/target hexanucleotide complexes by 2-aminopurine." *Nucleic Acids Res* 36(3): 885-896.
- Bernacchi, S. and Y. Mely (2001). "Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure." *Nucleic Acids Res* 29(13): E62-62.
- Campbell, S. and A. Rein (1999). "In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain." *J Virol* 73(3): 2270-2279.
- Campbell, S. and V. M. Vogt (1995). "Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* 69(10): 6487-6497.
- Cen, S., A. Khorchid, et al. (2000). "Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* 74(22): 10796-10800.
- Cimarelli, A., S. Sandin, et al. (2000). "Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA." *J Virol* 74(7): 3046-3057.
- Cristofari, G. and J. L. Darlix (2002). "The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 223-268.
- Cruceanu, M., M. A. Urbaneja, et al. (2006). "Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins." *Nucleic Acids Res* 34(2): 593-605.
- D'Souza, V. and M. F. Summers (2005). "How retroviruses select their genomes." *Nature Reviews Microbiology* 3(8): 643-655.
- Darlix, J. L., H. de Rocquigny, et al. (2014). "Retrospective on the all-in-one retroviral nucleocapsid protein." *Virus Res* 193: 2-15.
- Darlix, J. L., C. Gabus, et al. (1990). "Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1." *J Mol Biol* 216(3): 689-699.
- Egele, C., E. Piemont, et al. (2007). "The single-finger nucleocapsid protein of moloney murine leukemia virus binds and destabilizes the TAR sequences of HIV-1 but does not promote efficiently their annealing." *Biochemistry* 46(50): 14650-14662.
- Fisher, R. J., A. Rein, et al. (1998). "Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides." *J Virol* 72(3): 1902-1909.
- Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager, et al. (2012). "Assembly and architecture of HIV." *Adv Exp Med Biol* 726: 441-465.
- Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager, et al. (2008). "The structural biology of HIV assembly." *Curr Opin Struct Biol* 18(2): 203-217.
- Godet, J., H. de Rocquigny, et al. (2006). "During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem." *J Mol Biol* 356(5): 1180-1192.
- Godet, J., N. Ramalanjaona, et al. (2011). "Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer." *Nucleic Acids Res* 39(15): 6633-6645.
- Liang, J., H. Edelsbrunner, et al. (1998). "Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design." *Protein Sci* 7(9): 1884-1897.
- Mekdad, H. E., E. Boutant, et al. (2016). "Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling." *Retrovirology* 13(1): 54.

- Prescher, J., V. Baumgartel, et al. (2015). "Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites." *PLoS Pathog* 11(2): e1004677.
- Ramalanjaona, N., H. de Rocquigny, et al. (2007). "Investigating the mechanism of the nucleocapsid protein chaperoning of the second strand transfer during HIV-1 DNA synthesis." *J Mol Biol* 374(4): 1041-1053.
- Rein, A. (2010). "Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins." *RNA Biol* 7(6): 700-705.
- Rein, A., S. A. Datta, et al. (2011). "Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs." *Trends Biochem Sci* 36(7): 373-380.
- Roda, R. H., M. Balakrishnan, et al. (2002). "Strand transfer occurs in retroviruses by a pause-initiated two-step mechanism." *J Biol Chem* 277(49): 46900-46911.
- Rye-McCurdy, T. D., S. Nadaraja-Hoke, et al. (2014). "Mechanistic differences between nucleic acid chaperone activities of the Gag proteins of Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 are attributed to the MA domain." *J Virol* 88(14): 7852-7861.
- Schur, F. K., W. J. Hagen, et al. (2014). "Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution." *Nature* Nov 2. doi: 10.1038/nature13838.
- Sharma, K., P. Didier, et al. (2010). "Kinetic analysis of the nucleic acid chaperone activity of the hepatitis C virus core protein." *Nucleic Acids Res* 38(11): 3632-3642.
- Stewart-Maynard, K. M., M. Cruceanu, et al. (2008). "Retroviral nucleocapsid proteins display nonequivalent levels of nucleic acid chaperone activity." *J Virol* 82(20): 10129-10142.
- Stoylov, S. P. (2007). "Electro-optical investigations of the dipole moments of nanoparticles." *Colloids Surf B Biointerfaces* 56(1-2): 50-58.
- Sundquist, W. I. and H. G. Krausslich (2012). "HIV-1 assembly, budding, and maturation." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7): a006924.
- Swanstrom, R. and J. W. Wills (1997). *Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY).
- Vlach, J. and J. S. Saad (2015). "Structural and molecular determinants of HIV-1 Gag binding to the plasma membrane." *Front Microbiol* 6: 232.
- Vo, M. N., G. Barany, et al. (2009). "HIV-1 nucleocapsid protein switches the pathway of transactivation response element RNA/DNA annealing from loop-loop "kissing" to "zipper"." *J Mol Biol* 386(3): 789-801.
- Wang, W., N. Naiyer, et al. (2014). "Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein precursor NCp15 explain reduced viral infectivity." *Nucleic Acids Res* 42(11): 7145-7159.
- Wu, T., S. A. Datta, et al. (2010). "Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications." *Virology* 405(2): 556-567.
- Xing, L., C. Liang, et al. (2011). "Coordinate roles of Gag and RNA helicase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA." *J Virol* 85(4): 1847-1860.

Article 3

*RPL7, a novel partner of HIV-1 Gag
polyprotein enhancing its chaperone activity*

RPL7, a novel partner of HIV-1 Gag polyprotein enhancing its chaperone activity

H. Karnib¹, K. K. Sharma¹, C. Boudier¹, Y. Mély^{1*} and H. de Rocquigny^{2*}

¹Laboratory of biophotonics and pharmacology, UMR-7213, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France

²Inserm - U966 MAVIVH, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours Cedex 1, France

Introduction

Notre équipe a montré que la protéine humaine RPL7 était capable d'interagir avec le domaine NCp7 de Gag, qu'elle avait une activité de chaperonne des acides nucléiques plus efficace que Gag et que le complexe Gag-RPL7 possédait cette activité de manière supérieure à celle de chaque protéine (article 1).

Dans cet article le mécanisme d'hybridation des deux séquences complémentaires cTAR/dTAR en présence de la RPL7 ou du complexe Gag-RPL7 a été exploré. Nous montrons ici que le complexe protéique hybride cTAR/dTAR selon un mécanisme similaire à celui de la RPL7 mais en suivant les voies d'hybridation de Gag. Ce résultat expliquerait la raison pour laquelle le complexe Gag-RPL7 a une activité plus efficace que les protéines seules.

Résultats

Pour caractériser l'activité chaperonne de la RPL7 et du complexe Gag-RPL7, nous avons défini les conditions expérimentales où ces protéines n'agrègent pas les acides nucléiques. Comme présenté dans l'article 2 ces conditions ont été définies par FCS.

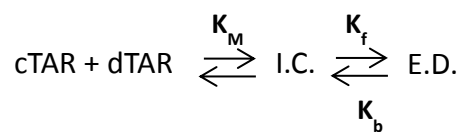
Pour cela, 100 nM de cTAR-Rhodamine sont mélangés avec différentes concentrations de RPL7 ou du complexe Gag-RPL7. Dans la figure 2 de la publication, le nombre de molécules qui diffuse reste stable jusqu'à un ratio 1/1 puis ce nombre diminue suggérant une agrégation du complexe oligo-protéique (Figure 2 de l'article). Nous avons donc utilisé le rapport acide nucléique/RPL7 de 1/1 et acide nucléique/Gag-RPL7 de 1/(0.5+0.5) dans nos expériences.

Etudes du mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la RPL7 ou de Gag-RPL7

Dans un premier temps, le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la RPL7 est étudié en mélangeant un excès d'oligonucléotide non marqué dTAR à sa séquence complémentaire doublement marquée Rh6G-cTAR-Dabcyl (conditions pseudo premier ordre). La formation du complexe étendu de 55 pb induit un éloignement entre la rhodamine et la dabcyll ce qui permet une restauration de la fluorescence de la rhodamine. Les résultats, montrent une augmentation de fluorescence d'un facteur 13 et 11 en présence de la RPL7 et du complexe Gag-RPL7 respectivement (table 1 de la publication) en accord avec les résultats décrit dans la publication El Mekdad et al, 2016 (article 1). Ces courbes obtenues sont analysées en utilisant la loi de bi-exponentielle :

$$I(t) = I_f - (I_f - I_0) \left(a e^{(-k_{obs1}(t-t_0))} - (1-a) e^{(-k_{obs2}(t-t_0))} \right)$$

Ensuite, ces cinétiques ont été réalisées avec une quantité croissante de dTAR-RPL7 (ou dTAR-Gag-RPL7) et les constantes de réactions k_{obs1} , k_{obs2} reportées en fonction de la concentration de dTAR. Comme le montre les figures 4 et 8 de l'article, une variation hyperbolique de k_{obs1} et k_{obs2} sont observées pour RPL7 et Gag-RPL7. La présence de ces deux constantes suggère que RPL7 et Gag-RPL7 hybrident cTAR/dTAR selon une réaction en deux étapes passant par un complexe intermédiaire (I.C.) qui sera transformé en complexe étendu (E.D.) selon la réaction suivante :



La formation de l'I.C. est gouvernée par la constante K_M calculée par l'analyse de k_{obs1} selon la loi hyperbolique ($k_{obs} = (k_f \times K_M \times dt) / (1 + (K_M \times dt))$). Cette variation hyperbolique du k_{obs1} suggère que cTAR et dTAR seront hybridés suivant deux voies parallèles. De plus, la formation de l'E.D. est gouvernée par k_f et k_b calculés par l'analyse de k_{obs2} selon la même loi hyperbolique. Ces résultats (table 1) montrent que les valeurs de K_M obtenues pour RPL7 et le complexe protéique sont similaires ; Gag-RPL7 forme I.C. à la même vitesse que RPL7. Par contre, la valeur de k_f obtenue avec Gag-RPL7 est trois fois supérieure à celle obtenue avec

RPL7. Ainsi Gag-RPL7 forme le complexe étendu trois fois plus rapidement que RPL7 (table 1).

Dans un deuxième temps, pour identifier les domaines nucléotidiques impliqués dans la voie d'hybridation, des mutants de cTAR et de dTAR ont été testés. La première séquence utilisée est la séquence dTAR-TL dans laquelle les bases situées dans la boucle ont été changées en T (Figure 1). Dans le cas de la RPL7, aucun changement significatif de la vitesse d'hybridation et des constantes cinétiques n'ont été observés avec cet oligonucléotide (table 1 dans l'article). Inversement, dans le cas de Gag-RPL7, une diminution des constantes cinétiques est observée avec dTAR-TL. Ce dernier résultat suggère que les boucles jouent un rôle dans l'hybridation de cTAR/dTAR en présence du complexe Gag-RPL7 mais pas en présence de RPL7 seule.

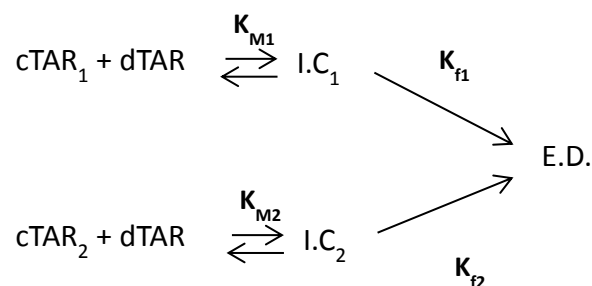
Pour savoir le rôle des tiges dans la réaction d'hybridation, nous avons utilisé la séquence cTAR1.2. Cette séquence possède une tige 4 fois plus stable que cTAR (Figure 1). Dans ce cas, la réaction d'hybridation est devenue très lente en présence de Gag-RPL7 et immesurable avec la RPL7. Ces résultats suggèrent que les tiges jouent un rôle majeur dans l'hybridation de cTAR/dTAR en présence de Gag-RPL7 et de RPL7.

Enfin, pour confirmer la présence de deux voies parallèles, l'énergie d'activation du système en présence de RPL7 et de Gag-RPL7 a été calculée. Pour cela, 10nM de cTAR doublement marqué est mélangé avec 100nM de dTAR/RPL7 ou dTAR/Gag-RPL7 puis incubé à différentes températures (10°C- 40°C). Les courbes sont ensuite traitées selon la loi bi-exponentielle ci-dessus, les constantes cinétiques k_{obs1} et k_{obs2} sont reportées en fonction de la température et les points sont ensuite analysés en utilisant l'équation d'Arrhenius : $K_i = A_i \exp^{(-E_{a,i}/RT)}$

L'analyse des résultats montre deux énergies d'activation en présence de RPL7 : $E_{a1} = 11 (\pm 0.6)$ Kcal/mol et $E_{a2} = 16 (\pm 0.8)$ Kcal/mol (Figure 5). Ces deux énergies correspondent à l'ouverture de 3 et 4 nucléotides respectivement. Sachant que RPL7 nécessite essentiellement les tiges, on peut suggérer que cette hybridation passe par une interaction entre les extrémités protrudentes (E_{a1}) et par une interaction entre les brins (E_{a2}) (Figure 5 de l'article). De même, deux énergies d'activation sont calculées en présence du complexe protéique Gag-RPL7 : $E_{a1} = 11 (\pm 0.7)$ Kcal/mol et $E_{a2} = 19 (\pm 1)$ Kcal/mol (Figure 9)

correspondant à l'ouverture de 3 et de 5 bases de l'oligonucléotide. Sachant que, dans le cas de Gag-RPL7, l'hybridation a lieu via les tiges et les boucles, on peut suggérer que l'énergie E_{a1} correspond ici à l'ouverture des boucles (3 nucléotides) et que E_{a2} correspond à l'ouverture des tiges (5 oligonucléotides) durant la réaction d'hybridation. De plus, ces résultats confirment la présence de deux populations d'oligonucléotides et donc de deux voies parallèles, que ce soit dans l'hybridation médiée par la RPL7 ou par le complexe.

Sur la base de ces résultats expérimentaux, nous pouvons proposer un mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR en présence de la RPL7 et du complexe Gag-RPL7 qui sera le suivant :



Enfin, tous les résultats des réactions en présence des mutants permettent de suggérer que l'hybridation en présence de la RPL7 ou du complexe Gag-RPL7 se fait selon un mécanisme en deux étapes passant par deux voies parallèles. Les différences se situent essentiellement au niveau des séquences puisque RPL7 hybride exclusivement à travers les tiges tandis que Gag-RPL7 hybride cTAR/dTAR via les tiges et les boucles.

Discussion

Notre équipe a récemment mise en évidence que la protéine Gag interagissait avec la protéine RPL7 et que cette interaction augmentait significativement l'activité chaperonne de Gag. Dans ce travail, nous avons comparé l'activité chaperonne de RPL7 et du complexe Gag-RPL7 et tenté d'expliquer le mécanisme permettant au complexe d'être plus efficace.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la RPL7 humaine seule hybride en passant exclusivement par les tiges selon un mécanisme en deux étapes passant par deux

voies parallèles. Ce mécanisme est similaire à celui trouvé avec le peptide E de la protéine core du virus HCV. En effet, la RPL7 et le peptide E possède la même valeur de K_{M1} et K_{M2} ce qui suggère que ces deux protéines forment le complexe intermédiaire avec la même vitesse. Par contre, les valeurs de k_{f1} et k_{f2} sont 40 fois plus élevées dans le cas de la RPL7 ce qui signifie que la RPL7 forme le complexe étendu avec une vitesse 40 fois supérieure au peptide E. En prenant en considération le ratio oligonucléotide/protéine utilisé dans les deux cas, qui est de 1/1 pour RPL7 et 4/1 pour le peptide E, nous démontrons on que la RPL7 est une meilleur chaperonne car elle est plus efficace que le peptide E à un ratio plus faible.

Parallèlement, notre équipe a étudié l'activité chaperonne de la protéine Gag du VIH-1 et montré que Gag hybride cTAR/dTAR selon un mécanisme en deux étapes passant par les tiges et les boucles (*Sharma KK, **Karnib H**, article 2*). Les deux protéines Gag et RPL7 ont donc deux mécanismes différents puisque la RPL7 passe exclusivement par les tiges. De manière intéressante, dans ce travail, les résultats montrent clairement que le complexe Gag-RPL7 hybride cTAR/dTAR en passant par les tiges et les boucles selon un mécanisme en deux étapes passant par deux voies parallèles ce qui correspond à un mélange du mécanisme des deux protéines. Ainsi, en se basant sur le mécanisme d'hybridation du complexe, nous remarquons donc un effet additif des mécanismes de Gag et de RPL7. Ces résultats expliquent les résultats des constantes cinétiques calculées précédemment dans la publication El Mekdad et al. 2016 et confirme notre modèle dans lequel on propose que la protéine Gag serait capable de recruter la RPL7 pour améliorer son activité chaperonne des acides nucléiques.

RPL7, a novel partner of HIV-1 Gag polyprotein enhancing its chaperone activity

Hassan Karnib¹, Kamal Kant Sharma¹, Christian Boudier¹, Yves Mély^{1*} and Hugues de Rocquigny^{2*}

¹Laboratory of biophotonics and pharmacology, UMR-7213, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France

²Inserm - U966 MAVIVH, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours Cedex 1, France

* mely@unistra.fr ; * hderocquigny@univ-tours.fr

Abstract

In HIV-1 infected cells, virion formation is orchestrated by Gag and the current view is that a specific interaction between newly made Gag molecules and the genomic RNA initiates the process (Summers and Karn 2011). This in turn would require chaperoning activity of Gag molecules during viral RNA dimerization. However the RNA chaperoning activity of Gag is low and probably need other co-factors to perform its optimal activity. One such partner is the human ribosomal protein L7 (RPL7), part of large ribosomal subunit that has been shown to interact with GagNC (NC domain in Gag) in a cellular context and *in vitro*. To understand the mechanism whereby RPL7 alone or in association with Gag (Gag-RPL7 complex) chaperones nucleic acid, we investigated the annealing mechanism of two complementary strands of stem-loops cTAR/dTAR (TAR is the RNA Trans Active Response element, dTAR the DNA version of TAR and cTAR is its complementary strand) in presence of RPL7 or Gag-RPL7 protein complex. First, we showed that the annealing of cTAR to dTAR takes place by a two-step mechanism leading to intermediate complex prior to the formation of an extended duplex. This annealing is mediated exclusively by the stems in presence of RPL7 while both the stem and the loops are involved in presence of Gag-RPL7 complex. Interestingly, when both proteins are together, annealing follows the Gag mechanism but its ≈ 3 times more efficient. These results indicate that Gag and RPL7 cooperate in the annealing reaction favoring the notion that Gag recruits RPL7 to boost its chaperone activity in order to initiate the assembly process.

INTRODUCTION

In HIV-1 infected cells, the integrated viral DNA is transcribed by the host cell machinery generating the full-length viral RNA (FL RNA), a large fraction of which undergoes splicing to give rise to single and multi-spliced viral mRNAs. Once exported from the nucleus to the cytoplasm, the FL RNA can be recruited by active ribosomes to direct synthesis of the Gag and GagPol precursors. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag polyprotein (herein after used as “Gag” in the article) plays a critical role in the assembly of HIV-1 virion by using the viral RNA as a scaffold for Gag oligomerization and in the selection of the gRNA (Vogt 1997; Freed 1998). This 55-kDa multidomain protein consists of the matrix (MA), capsid (CA), Spacer peptides SP1 and SP2, nucleocapsid (NC) and P6 (D'Souza and Summers 2005; Rein, Datta et al. 2011).

The HIV-1 Gag orchestrates RNA dimerization and encapsidation via its NC domain (named GagNC). However the RNA chaperoning activity, i.e. the ability of a protein to drive Nucleic acid structural changes in their most stable conformation (Godet and Mely 2010), of Gag is low (Cruceanu, Urbaneja et al. 2006; Rein 2010; Wu, Datta et al. 2010; Wang, Naiyer et al. 2014) as compared to the mature form of the nucleocapsid protein NCp7. This prompted us to search for GagNC co-factors. Our team showed that the human ribosomal protein L7 (RPL7), part of large ribosomal subunit, interacts with GagNC in a cellular context and *in vitro* (Mekdad, Boutant et al. 2016). In addition, using the annealing mechanism of cTAR/dTAR (TAR is the RNA Trans Active Response element, dTAR the DNA version of TAR and cTAR is its complementary strand), we showed that RPL7 has a higher nucleic acid chaperone activity than Gag and that the mixture of both proteins was found more efficient than each protein alone (Mekdad, Boutant et al. 2016). Additionally, our team detailed this cTAR/dTAR annealing mechanism by HIV-1 Gag and showed that Gag anneal the stem-loop sequences by a two steps mechanism. This annealing of TAR sequences is mediated by both stems and loops passing through an intermediate complex (I.C.) formation, prior to its final extended duplex (E.D.) (Sharma KK, Karnib H, to be submitted).

In this work, we investigated the annealing mechanism of cTAR/dTAR in presence of RPL7 alone and mixture of both Gag and RPL7 proteins (Gag-RPL7 complex). First, we showed that the annealing of cTAR to dTAR takes place by a two-step mechanism leading to intermediate complex formation prior to its final stage as an extended duplex (E.D.). This annealing is mediated exclusively by the stems in presence of RPL7 alone, but when both

proteins are together, cTAR/dTAR annealing follows both stem-stem and loop-loop interactive pathways. These results indicate that Gag and RPL7 cooperate in the annealing reaction favoring the notion that Gag recruits RPL7 to boost its chaperone activity in order to initiate the assembly process.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides

The unlabeled and the labeled oligonucleotides were synthesized by IBA GmbH Nucleic Acids product Supply (Gottingen, Germany). In the case of the doubly labeled ODNs, the 5' terminus was labeled with 5(6)-Carboxytetramethylrhodamine (TMR) or ethyl 2-[3-(ethylamino)-6-ethylimino-2, 7-dimethylxanthen-9-yl] benzoate hydrochloride (Rh6G) via an amino-linker with a six carbon spacer arm while the 3' terminus was labeled with 4-(40 - dimethylaminophenylazo) benzoic acid (Dabcyl). Oligonucleotides were purified by reverse-phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. Experiments were performed in 50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ and 1mM DTT at 20°C.

Figure 1: Oligonucleotides used in the Study.

(A) The oligonucleotide sequences are from the HIV-1 MAL strain. The secondary structures of the oligonucleotides were predicted from the structure of TAR (Baudin F et al., 1993) and the mfold program.

cTAR	cTAR12	TAR	dTAR	dTAR-TL
C C	C C	C G G	C G G	T T
C G	C G	C G	C G	T T
T C-G	T C-G	C A	C A	T T
G-C	G-C	C-G	C-G	C-G
A-T	A-T	A-U	A-T	A-T
G-C G	G-C G	C-G C	C-G C	C-G C
A A	A A	U U	T T	T T
G-C C	G-C C	G-G C	G-G C	G-G C
A-T	A-T	A-U	A-T	A-T
C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
C-G T	C-G T	C-G	C-G	C-G
G-C	G-C	A	A	A
A-T	A-T	G-C	G-C	G-C
T-A	T-A	A-U	A-T	A-T
C-A	C-A	U-A	T-A	T-A
G-C	G-C	U-G	T-G	T-G
T-A	T-A	G-C	G-C	G-C
T-A	T-A	U-A	T-A	T-A
C-G	C-G	U-A	T-A	T-A
C-G A	C-G A	U C-G	T C-G	T C-G
T-A	T-A	C-G	C-G	C-G
T-A G	T-A G	U-A	T-A	T-A
G-C	G-C	C	C	C
G-C	G-C	U-A	T-A	T-A
		G-C	G-C	G-C
		G-C	G-C	G-C

HIV-1 Gag and human ribosomal protein L7 (RPL7) purification

HIV-1 Gag and the human RPL7 were purified as already described (Dieci, Bottarelli et al. 2000; McKinsty, Hijnen et al. 2014; Mekdad, Boutant et al. 2016). Briefly, protein production was performed in 50 mL LB containing kanamycin (50 mg/mL) and either chloramphenicol (25 mg/mL) to express HIV-1 Gag, or ampicillin (50 mg/mL) to express RPL7. Protein expression was induced by addition of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C or of 0.5 mM IPTG for 16 h at 18°C for RPL7 or Gag, respectively. Gag was purified using nickel affinity column as described previously by the group of Johnson Mak (McKinsty, Hijnen et al. 2014). Additionally, RPL7 was purified using Nickel column equilibrated with in 25mM Tris, 0.1mM NaCl, 8M urea, pH=8, eluted with a with a buffer containing 25mM Tris, 0.1mM NaCl, 8M urea, 500mM imidazole, pH=8 and dialyzed 20 hours at 4°C (two changes) against 2L of renaturing buffer (25mM Tris, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 10% glycerol, pH=8). Proteins purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis. Their concentration was measured from their absorbance at 280 nm using $\epsilon_{\text{RPL7}} = 27390 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{\text{Gag}} = 62045 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Fluorescence correlation spectroscopy setup and data analysis

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements were performed on a two-photon platform based on an Olympus IX70 inverted microscope, as described previously (Azoulay, Clamme et al. 2003). Two-photon excitation at 850 nm was provided by a mode-locked Tsunami Ti:sapphire laser pumped by a Millennia V solid-state laser (Spectra Physics, USA). The experiments were performed in a 96 wells plate coverglass, using a 200 μL volume per well. The focal spot was set about 20 μm above the coverslip. Human RPL7 or Gag-RPL7 protein complex was added to the labeled cTAR sequences at different nucleotide to protein ratios. To avoid high local concentrations during mixing, both reactants were of the same volume. Assuming that protein diffuse freely in a Gaussian excitation volume, the normalized autocorrelation function, $G(\tau)$, was fitted according to:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1/2} \quad \text{Equation 1}$$

Where τ_d is the diffusion time, N is the mean number of molecules within the excitation volume and S is the ratio between the axial and lateral radii of the excitation volume. The

point spread function of the set-up was determined from a z-scan on one fluorescent bead (20 nm in diameter). The measured lateral and axial resolutions were respectively 0.3 and 1 μm , typical data recording times were 10 min. Hundred autocorrelation curves were recorded for each sample. When spikes of high fluorescence intensity, most likely associated to aggregates, were observed in the fluorescence fluctuation profiles, the corresponding autocorrelation curves were discarded. In these conditions, the average autocorrelation curve calculated from the sum of the remaining autocorrelation curves could be adequately fitted by a single population model with a diffusion time close to that of cTAR alone.

Fluorescence measurements

Emission spectra and kinetic traces were recorded with FluoroMax spectrofluorimeters (Horiba, Jobin Yvon Instruments) equipped with a temperature-controlled cell compartment. All fluorescence intensities were corrected for buffer emission and lamp fluctuations.

Kinetic measurements were performed in pseudo first-order conditions by using concentrations of unlabeled TAR and dTAR at least 10-fold higher than the concentration of the labeled complementary sequence. The protein to oligonucleotide ratio was 1:1 for RPL7 alone and 0.5:0.5:1 for Gag-RPL7. Excitation and emission wavelengths were 520 and 555 nm, respectively, to monitor the Rh6G or TMR fluorescence. All reported concentrations correspond to those after mixing. To avoid high local concentrations during mixing, both reactant mixtures were prepared of the same volume. Peptides were added to each reactant separately, and then the reaction was initiated by mixing the protein-oligonucleotide together. The apparent rate constants k_{obs} and the amplitudes were determined from the kinetic traces by including a dead-time correction t_0 to take into account the delay between the mixing of reactants and the start of the measurements. All fitting procedures were carried out with OriginTM 8.6 software based on nonlinear, least-square methods and the Levenberg-Marquardt algorithm.

The temperature dependence of the annealing kinetics was carried out with 10 nM doubly labeled cTAR derivatives and 100 nM nonlabeled dTAR derivatives at different temperatures (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C and 40°C) in the presence of human RPL7 or Gag-RPL7 complex added at a protein to oligonucleotide ratio of 1:1.

Results

Analysing non-aggregation condition by Fluorescence Correlation Spectroscopy

In order to characterize the nucleic acid chaperone (NAC) properties of the RPL7 and Gag-RPL7 complex, we first investigated the experimental conditions where the proteins did not cause DNA aggregation in a manner similar to other NA chaperones (Cristofari and Darlix 2002; Egele, Piemont et al. 2007; Stoylov 2007). To this end, NA aggregation was investigated by means of fluorescence correlation spectroscopy (FCS), since such aggregation by positively charged bio-molecules is concentration-dependent (Stoylov 2007). As showed in earlier studies (Boudier, Storchak et al. 2010; Sharma, Didier et al. 2010)(Sharma kk, Karnib H, to be submitted), aggregation of the 5'-TMR- cTAR molecules by the RPL7 or Gag-RPL7 complex would be expected to decrease the number of fluorescent species passing through the FCS focal volume.

To acquire aggregation free conditions for proteins, experiments were performed at 100 nM ODN concentration. In the absence of proteins, the number of the diffused fluorescent cTAR molecules in the excitation volume was fully consistent, by adding an increasing concentration of protein (RPL7 black squares, Gag-RPL7 complex, red dots); we found slight decrease in the number of fluorescent species up to a protein/ODN ratio of 1:1, indicating that no aggregation occurred under these conditions (Figure 2). However, higher ratios (1.5:1, 2:1 and 4:1) showed a sharp drop in the number of fluorescent species diffused indicating the presence of aggregates (Figure 2). As a consequence, a protein/ODN ratio of 1:1 for RPL7 and Gag-RPL7 complex was selected for characterizing the chaperone properties of these proteins.

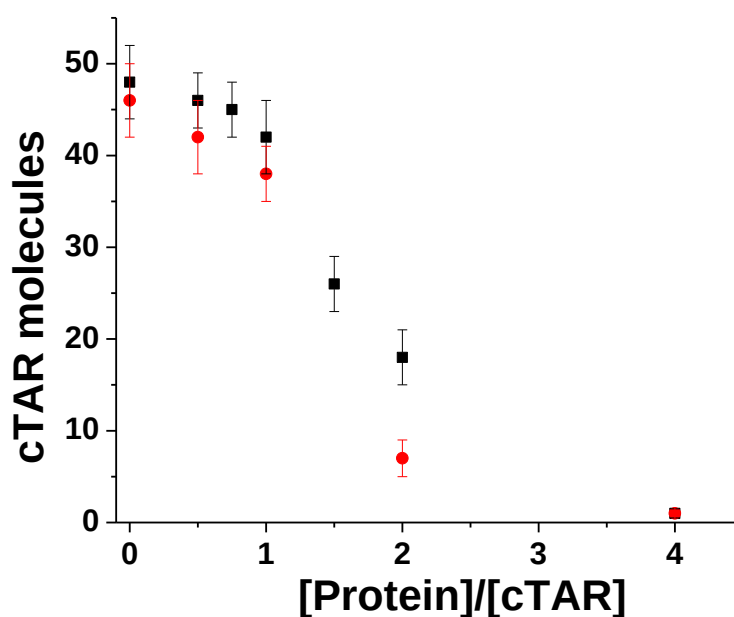


Figure 2: FCS study for RPL7 or Gag-RPL7 complex in presence of cTAR-TMR. Autocorrelation curves of 100nM of 5'-TMR-cTAR in the presence of RPL7 (black squares) or Gag-RPL7 (red dots) shows that the number of cTAR molecules decrease after protein/oligonucleotide ratio 1/1 showing the presence of aggregates in the solution

Kinetics of cTAR/dTAR annealing in presence of human RPL7

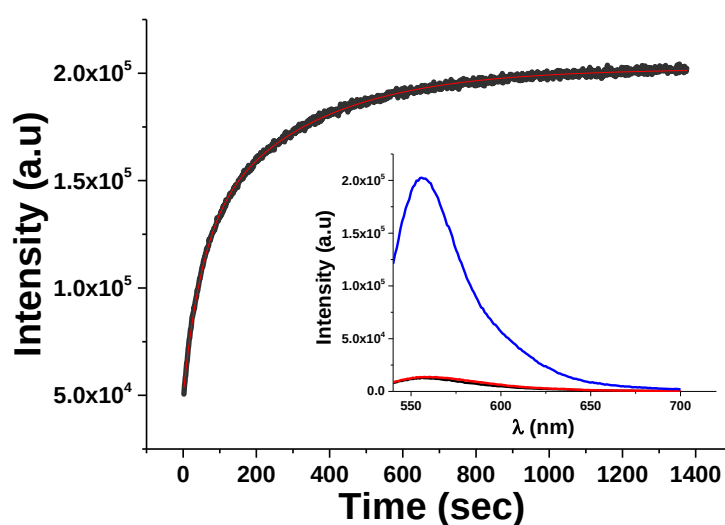


Figure 3: Kinetic of cTAR/dTAR annealing in the presence of RPL7. Kinetic reaction performed between 10 nM doubly labeled cTAR with 1000 nM dTAR in the presence of RPL7 added at Protein/ODN molar ratio of 1:1;

the continuous line describes the best fit of the data according to equation 2 with $k_{obs1} = 1.7(\pm 0.1) \times 10^{-2} s^{-1}$, $k_{obs2} = 3(\pm 0.4) \times 10^{-3} s^{-1}$ and $a = 0.6 (\pm 0.1)$. Inset: emission spectra of the doubly labeled cTAR in the presence of RPL7 added at a Protein/ODN molar ratio of 1:1 before (red) and after completion of the annealing reaction with dTAR (blue).

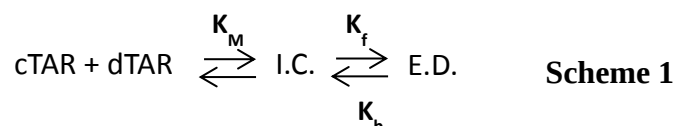
To characterize the annealing mechanism by which RPL7 hybridizes cTAR and dTAR, annealing reactions were performed by mixing 10nM of Rh6G-5'-cTAR-3'-Dabcyl (named as cTAR-Beacon) and 100 nM of non-labelled dTAR in presence of RPL7 at protein/ODN molar ratio of 1:1. The proximity of cTAR ends induces a strong fluorescence quenching of the Rh6G by the dabcyl, the formation of the 55 bp extended duplex (ED) increases the distance between the Rh6G and dabcyl leading to recover Rh6G emission (Bernacchi and Mely 2001). As shown in figure 3, RPL7 accelerates annealing reaction and formation of E.D to less than 30 min, when it was more than 24 hours in absence of protein (Godet, de Rocquigny et al. 2006).

The annealing traces were fitted using the bi-exponential equation:

$$I(t) = I_f - (I_f - I_0) \left(a e^{(-k_{obs1} \times (t-t_0))} - (1-a) e^{(-k_{obs2} \times (t-t_0))} \right) \quad \text{Equation 2}$$

Where t_0 represents the dead time of the reaction, $k_{obs1,2}$ are the rate constants of the reaction, a , the amplitude of the fast component, finally I_0 and I_f are the fluorescence intensities associated to the stem loop and the ED forms respectively.

With varying dTAR concentration a hyperbolic behavior for both k_{obs1} and k_{obs2} values (figure 4) was observed which is consistent with a two-step reaction where a rate-limiting interconversion step (k_f) is coupled to a much faster, preceding binding step, considered as a pre-equilibrium (K_M) (scheme 1):



Where I.C. corresponds to the intermediate complex. The dTAR concentration dependence of both k_{obs1} and k_{obs2} values was fitted using:

$$k_{obs} = (k_f \times K_M \times dt) / (1 + (K_M \times dt)) \quad \text{Equation 3}$$

Values of $5.2 (\pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $1.5 (\pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ were obtained for K_{M1} and K_{M2} , the equilibrium binding constants of the intermediate complexes associated to the fast and slow kinetic component, respectively. Moreover, values of $19.3(\pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $5.1 (\pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ were obtained for the sum of the forward k_{f1} , k_{f2} and backward k_{b1} , k_{b2} interconversion rate constants associated to the two kinetics components. The values of k_{b1} and k_{b2} were very low ($< 0.00005 \text{ s}^{-1}$) and could not be determined from the experimental data, indicating that RPL7 is unable to dissociate the E.D

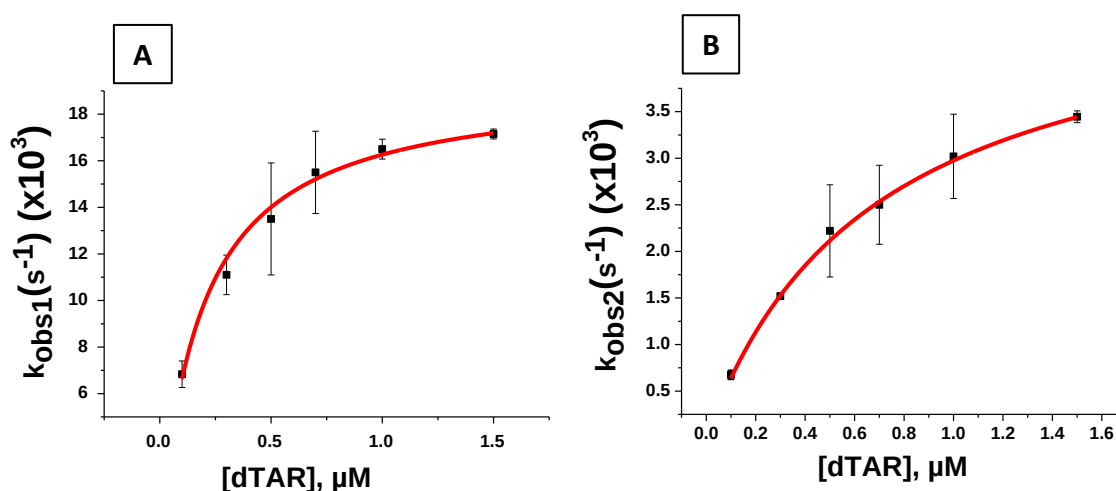
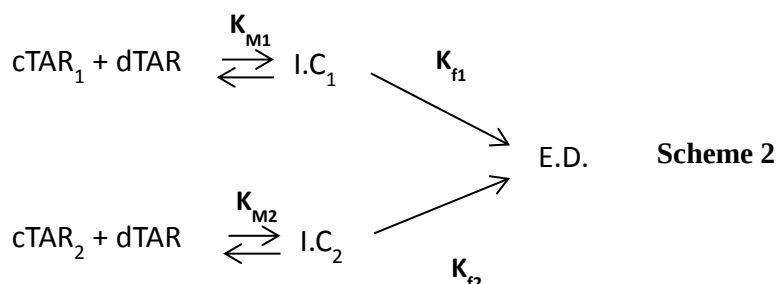


Figure 4: Kinetic parameters of cTAR/dTAR annealing in presence of RPL7. The fast (k_{obs1}) (A) and slow (k_{obs2}) (B) components were determined in pseudo-first-order conditions from real time kinetics as described in Figure 2. The solid line correspond to the fit of the data with the equation 3 and the K_M and k_f values given in table 1.

This hyperbolic progression of both k_{obs} values and in analogy to Sharma et al., 2010 (Sharma, Didier et al. 2010), our kinetic data suggests a reaction mechanism with two parallel kinetic pathways that involves two different cTAR/RPL7 complexes (cTAR₁, cTAR₂) represented in scheme 2:



Where $I.C_1$ and $I.C_2$ are the intermediate complexes of the fast and slow pathways, respectively and k_{f1} , k_{f2} are the corresponding interconversion rate constants.

To investigate more deeply the nature of the two pathways, temperature dependence of the k_{obs} values were performed using 10 nM doubly labelled cTAR and 100 nM non-labelled dTAR (Figure 5). Data were fitted using the Arrhenius equation:

$$K_i = A_i \exp^{(-E_{a,i}/RT)} \quad \text{Equation 4}$$

Where the rate constant K_i is given by $k_{obs,i}/[dTAR]$, A_i is the pre-exponential Arrhenius factor, $E_{a,i}$ is the activation energy, R is the universal gas constant and T is the temperature (in Kelvin).

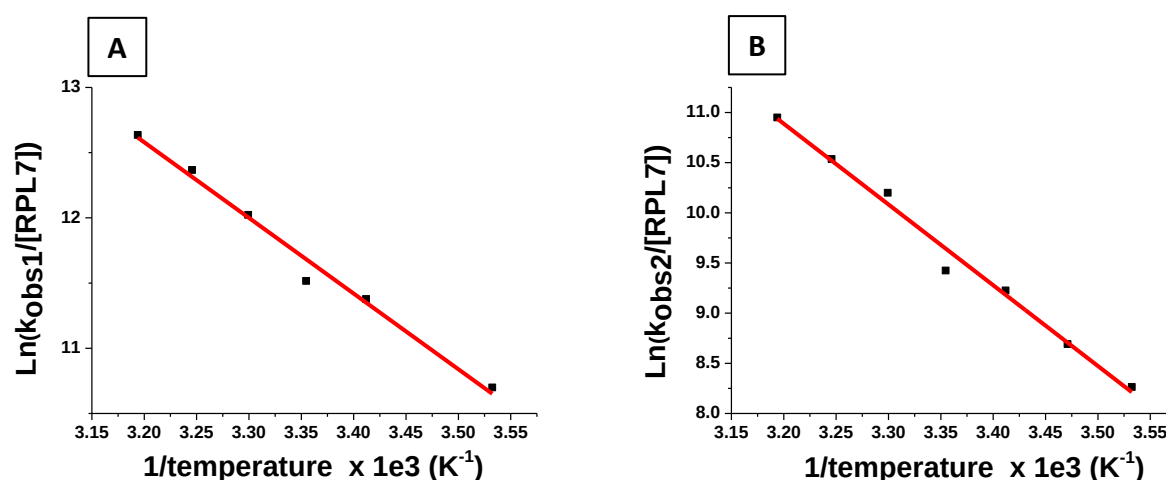


Figure 5: Temperature dependence of cTAR/dTAR annealing kinetics in presence of RPL7 at a molar ratio of 1:1. The reaction was performed with 10 nM doubly labeled cTAR and 100 nM dTAR. The logarithme of the rate constant values for the fast (A) and slow (B) components are indicated at seven different temperatures. The solid red line is the best fit using the Arrhenius equation giving $E_{a1} = 11 (\pm 0.6)$ Kcal/mol and $E_{a2} = 16 (\pm 0.8)$ Kcal/mol, for the fast and slow components respectively. It was checked that no aggregation was associated with the changes in temperature. To note that error bars are superposing with the points.

It was observed that both reaction rates increased with an increase in temperature (Figure 5), giving positive enthalpy values for the transition state of $11 (\pm 0.6)$ Kcal/mol and $16 (\pm 0.8)$ Kcal/mol for the fast and slow component, respectively. These values indicates that cTAR/dTAR annealing promoted by the human RPL7 involve pre-melting of ≈ 3 to 5 bp for the fast and slow pathways (Boudier, Storchak et al. 2010; Sharma, Didier et al. 2010).

Effects of oligonucleotide sequence and stability on human RPL7 promoted cTAR/dTAR annealing kinetics

We further investigated the impact of the sequence and stability of oligonucleotides on RPL7 mediated cTAR/dTAR annealing. First, dTAR was substituted for dTAR-TLoop (dTAR-TL) where the 6 nucleotides of the loop were changed to T residues (Figure 1) thus preventing base-pairing with the cTAR loop. As shown in figure 6, no changes in fluorescence time trace (red curve) and in the values of kinetic parameters (K_M and k_f) (Table 1) were observed as compared to cTAR/dTAR annealing. This indicates that loop-loop interaction do not play a role in the RPL7 promoted cTAR/dTAR annealing reaction.

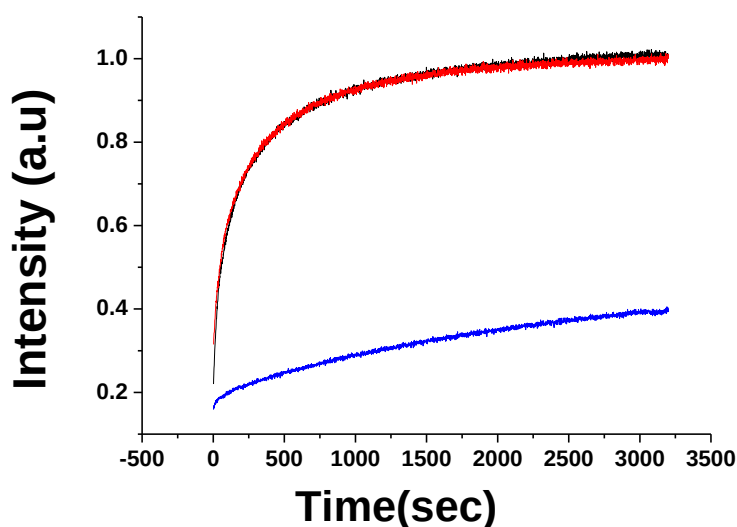


Figure 6: Different annealing reaction between two complementary strands of nucleic acid in presence of RPL7 in a protein/oligonucleotide ratio of 1:1. Black and red curves present the annealing of 10 nM of doubly labeled cTAR with 500 nM of dTAR or dTAR-TL respectively, and blue curve present the annealing between 10nM of cTAR-1.2 and 500nM of dTAR.

Furthermore, the role of the cTAR stem was investigated by using cTAR-1.2 mutant. The stem of this sequence was shown almost four times more stable than cTAR stem (Beltz, Azoulay et al. 2003)(Figure 1). The annealing of this mutant to dTAR was extremely slow in presence of RPL7 (Figure 6, blue curve). Additionally, we were not able to fit the data or to observe the final E.D formation. Taken together, our data indicated that kinetic pathways of the RPL7-promoted cTAR/dTAR annealing reaction are nucleated through a stem-stem interaction.

All together, we can suggest that cTAR/dTAR annealing in presence of RPL7 is going through the stems via two parallel pathways as shown in figure 7.

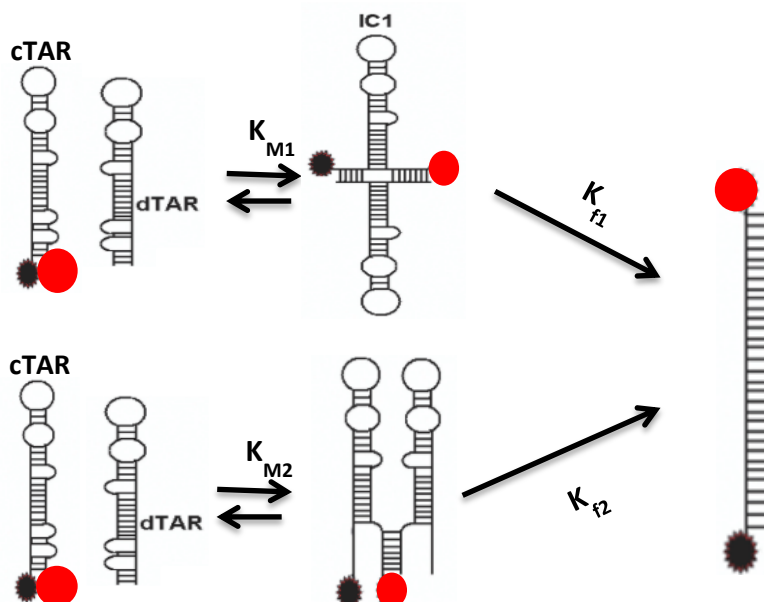


Figure 7: Annealing mechanism of cTAR/dTAR in presence of RPL7.

Kinetics of cTAR/dTAR annealing in presence of mixture containing both HIV-1 Gag and human RPL7 and the effect of oligonucleotide sequence and stability on the annealing reaction

Recent study showed the nucleic acid chaperone activity of Gag was increased in presence of RPL7, in this previous work, the real time kinetic between cTAR/dTAR in presence of Gag-RPL7 was shown to be faster than each protein alone (Mekdad, Boutant et al. 2016). To understand the mechanism whereby Gag-RPL7 complex chaperones nucleic acid we investigated the mechanism behind cTAR/dTAR annealing in presence of the Gag-RPL7 complex on a protein/oligonucleotide molar ratio of 1:1. Using similar method as explained earlier, fitting of kinetic traces with equation 2 and dTAR concentration dependence showed the hyperbolic variations for both k_{obs1} and k_{obs2} values (figure 8). In analogy to RPL7 mediated cTAR/dTAR annealing, Gag-RPL7 complex mediated annealing reaction involves two parallel pathways.

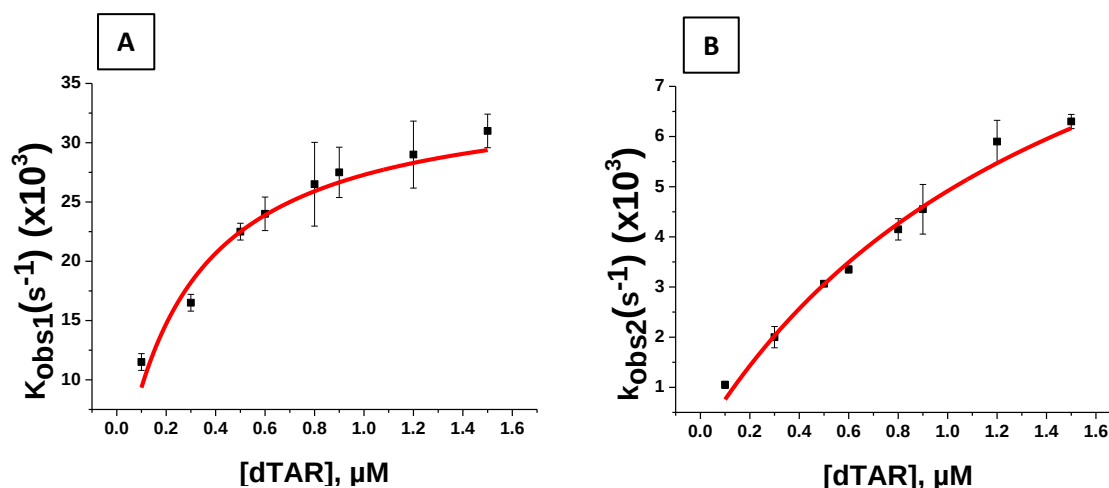
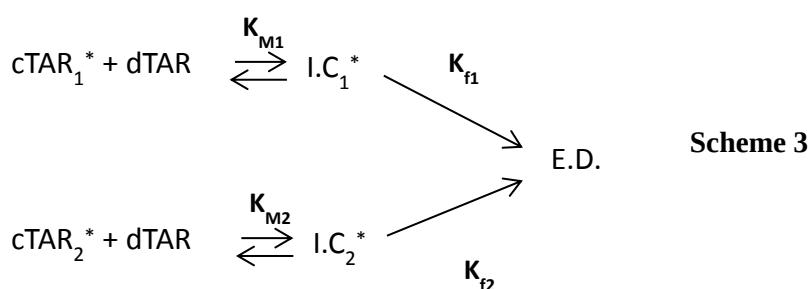


Figure 8: Kinetic parameters of cTAR/dTAR annealing in presence of Gag-RPL7 complex. The fast (k_{obs1}) (A) and slow (k_{obs2}) (B) components were determined in pseudo-first-order conditions from real time kinetics as described before. The solid line correspond to the fit of the data with the equation 3 and the K_M and k_f values given in table 1.

Gag-RPL7 mediated cTAR/dTAR annealing showed marginal differences for the values of K_{M1} ($4(\pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and K_{M2} ($1(\pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) as compared to RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing, indicating similar intermediate complex formation. However, ~ 3 -fold increase in the values of k_{f1} ($35(\pm 3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) and k_{f2} ($13(\pm 1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) were obtained (Table 1), suggesting the role of Gag-RPL7 complex during rate limiting kinetic step that leads to formation of ED. Again, taking data together, a reaction mechanism with two parallel kinetic pathways involving two different cTAR/Gag-RPL7 complexes ($cTAR_1^*$, $cTAR_2^*$) can be proposed:



Where $I.C_1^*$ and $I.C_2^*$ are the intermediate complexes of the fast and slow pathways and k_{f1} , k_{f2} are the corresponding interconversion rate constants.

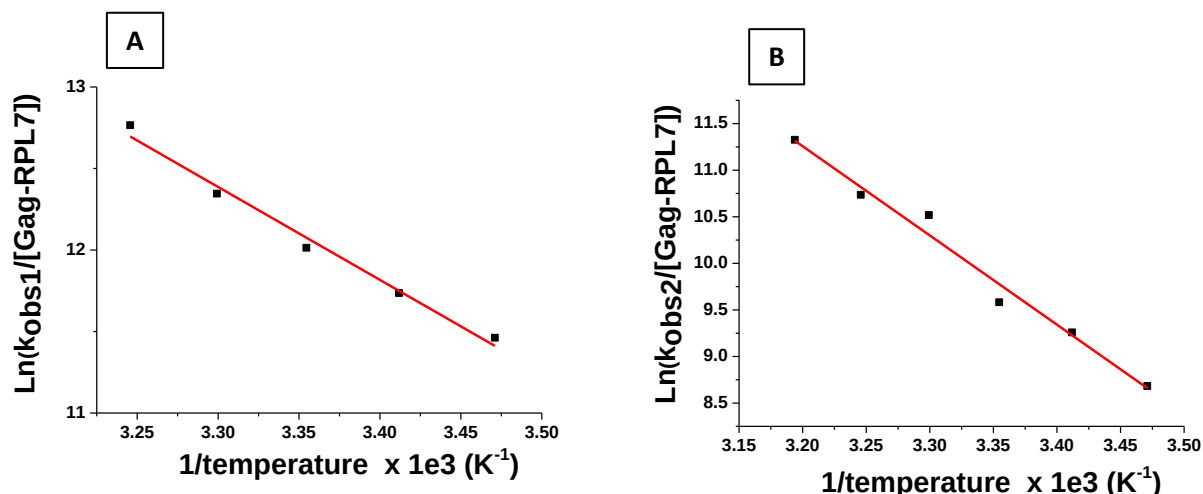


Figure 9: Temperature dependence of cTAR/dTAR annealing kinetics in presence of Gag-RPL7 at a molar ratio of 1:1. The reaction was performed with 10 nM doubly labeled cTAR and 100 nM dTAR. The logarithm of the rate constant values for the fast (A) and slow (B) components is indicated at six or seven different temperatures respectively for k_{obs1} and k_{obs2} . The solid red line is the best fit using the Arrhenius equation giving $E_{a1} = 11 (\pm 0.7)$ Kcal/mol and $E_{a2} = 19 (\pm 1)$ Kcal/mol, for the fast and slow components respectively. It was checked that no aggregation was associated with the changes in temperature. To note that error bars are superposing with the points

Temperature dependence of Gag-RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing showed similar positive enthalpy values for the transition state of $11 (\pm 0.7)$ Kcal/mol and $19 (\pm 1)$ Kcal/mol for the fast and slow component respectively, as compared to RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing. Likewise, these values indicated that Gag-RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing involved pre-melting of ≈ 3 to 7 bp for the fast and slow pathways, respectively.

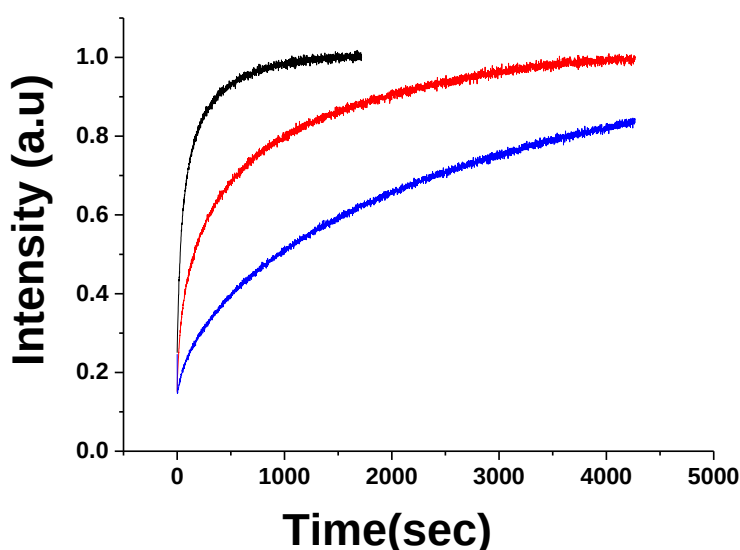


Figure 10: Different annealing reaction between two complementary strands of nucleic acid in presence of Gag-RPL7 in a protein/oligonucleotide ratio of 1:1. Black and red curves present the annealing of 10 nM of doubly labeled cTAR with 300 nM of dTAR or dTAR-TLoop respectively, and blue curve present the annealing between 10nM of cTAR-1.2 and 300nM of dTAR.

We further investigated the pathways by which Gag-RPL7 complex mediates cTAR/dTAR annealing, by using dTAR-TL or cTAR-1.2. The Gag-RPL7-mediated cTAR/dTAR-TL annealing showed a delay in the fluorescence time trace (Figure 10, red curve) and a decrease in kinetic parameters (Table 1) as compared to cTAR/dTAR annealing, indicating the significance of loop-loop interactions in presence of Gag-RPL7 complex. Sequentially, we investigated the effect of the stems, by substituting cTAR by cTAR-1.2 (Figure 10, blue curve). The annealing of this stem mutant to dTAR was found slower than cTAR/dTAR and cTAR/dTAR-TL showing that the annealing is also affected by the stability of the stems. These results suggested that the Gag-RPL7 mediated annealing of cTAR and dTAR goes through pathways that involved both the stem-stem and the loop-loop interactions (figure 11).

Taken together these results indicated that the enthalpy value 11 Kcal/mol can be assigned to the fast kinetic pathway that initiates with the opening of 3pb in the loop of cTAR, results annealing through the loop-loop interaction (Figure 11). Similarly, the enthalpy value of 19 Kcal/mol can be assigned to the slow kinetic pathway that lead to the stem destabilization and subsequent annealing through stem-stem interaction (Figure 11).

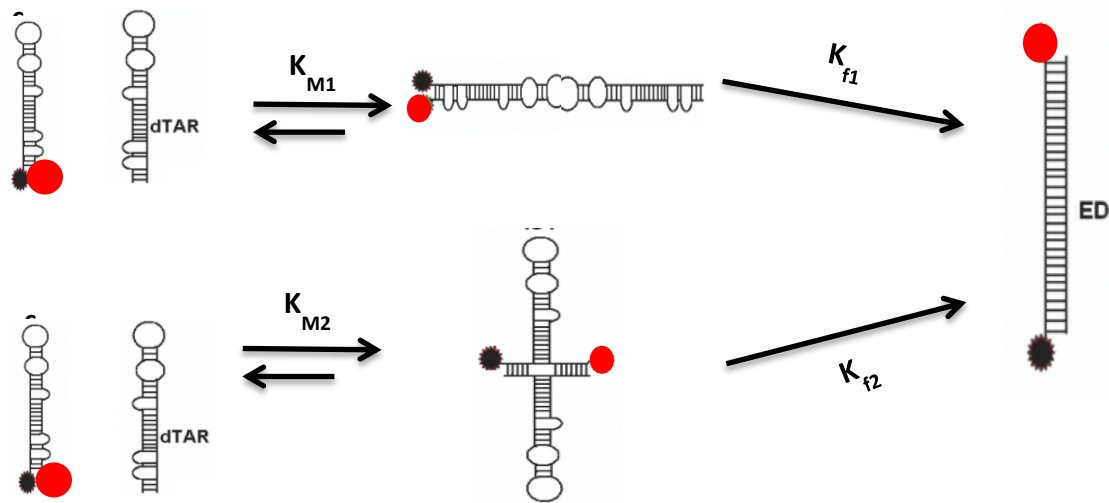


Figure 11: Annealing mechanism of cTAR/dTAR in presence of Gag-RPL7 complex.

Table 1: Kinetic parameter of cTAR/dTAR annealing and their respective mutants in presence of human RPL7 and Gag-RPL7 protein complex

labeled Oligo	Comp Oligo	Protein	Ratio	a	K_{M1} (M^{-1}) $\times 10^6$	K_{M2} (M^{-1}) $\times 10^6$	k_{fl} (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	k_{ρ} (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	If/I0
cTAR	dTAR	RPL7	1	0.6 (± 0.1)	5.2(± 0.3)	1.5(± 0.2)	19.3(± 0.5)	5.1 (± 0.6)	11(± 1)
	dTAR-								
cTAR	TL	RPL7	1	0.5 (± 0.08)	11.7 (± 1)	2.9(± 0.4)	16.4(± 0.2)	2.9 (± 0.3)	9(± 1)
				0.54	0.4				
cTAR	TAR	RPL7	1	(± 0.06)	(± 0.05)	0.3(± 0.1)	38 (± 3)	5 (± 1)	11(± 1)
		Gag-							
cTAR	dTAR	RPL7	1	0.8 (± 0.1)	4(± 0.7)	1(± 0.1)	35(± 3)	13 (± 1)	13(± 2)
		Gag-							
cTAR	TL	RPL7	1	0.8(± 0.2)	4(± 1)	2.3(± 1)	19.2 (± 1)	1.8 (± 0.3)	10(± 1)

DISCUSSION

In HIV-1 infected cells, RNA dimerization and virus assembly are orchestrated by the structural polyprotein precursor Gag. During RNA dimerization, Gag is thought to rearrange nucleic acids into their most thermodynamically stable state due to virtue of its nucleic acid chaperone activity (Campbell and Rein 1999; Cimarelli, Sandin et al. 2000; Wang and Aldovini 2002). However, Gag has a poor NAC activity (Cen, Khorchid et al. 2000; Xing, Liang et al. 2011) which leads to stipulate that Gag could interact with a partner that enhances

its chaperone activity. In this context, RPL7 was shown to interact and enhance the NAC activity of Gag (Mekdad, Boutant et al. 2016). Here, we are exploring the mechanism by which RPL7 and Gag-RPL7 anneal cTAR to dTAR. In pursuit of our goal, for the first time, we explored NAC activity of the human RPL7 protein and able to propose a model for the RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing. Interestingly, the annealing mechanism in presence of RPL7-mediated cTAR/dTAR annealing is found similar as to that of the HCV core protein (Sharma, Didier et al. 2010). By comparing, it was observed that both RPL7-mediated and HCV core-mediated cTAR/dTAR annealing goes through similar ICs as evidenced by similarities between equilibrium constants (Sharma, Didier et al. 2010). However, a ~40-fold increase in the values of both k_{f1} and k_{f2} during RPL7-mediated annealing, compared to HCV core mediated, suggested that the formation of the E.D. is much faster in presence of RPL7. This enhancement for the rate of E.D. formation could partially be attributed to the higher coverage of oligonucleotides base-pairs by RPL7 as compared to core peptides. This observation is supported by the higher charges associated to RPL7, as compared to core peptide, as a consequence of its ~5-fold higher molecular weight.

Furthermore, Gag-RPL7 complex showed an increase in the annealing speed reaction as compared to RPL7 alone, this higher speed annealing reaction was associated with a ~3-fold increase in the rate of E.D. formation. In addition to this, the Gag-RPL7 mediated cTAR/dTAR annealing progresses through both loop-loop and stem-stem interactive pathways, instead of only stem-stem interaction as in case of RPL7 alone. Additionally, we have showed that the cTAR/dTAR annealing reaction has a higher speed in presence of Gag-RPL7 than in presence of Gag alone (Mekdad, Boutant et al. 2016), and by exploring the Gag mediated cTAR/dTAR annealing mechanism we found that its going through the similar pathways as Gag-RPL7 (stems and the loops) (Sharma kk, karnib H et al, to be submitted). This indicates that both proteins, RPL7 and Gag, present an additive effect which can enhance the annealing of nucleic acids. In addition to this, Gag-RPL7 complex mediated nucleic acid annealing also supersedes the rates by which HIV-1 NCp7 and Tat anneals cTAR to dTAR (Godet, de Rocquigny et al. 2006; Boudier, Storchak et al. 2010), most probably due to its higher charge and oligonucleotide coverage.

These results provide a notion where Gag is able to recruit RPL7 in order to increase its NAC activity by utilizing additional stem-stem annealing pathway. In the end, such symbiosis between RPL7 and Gag could be transmitted from an in vitro model, showing a better annealing of cTAR/dTAR, to the viral genomic RNA that will dimerize faster in the presence

of Gag-RPL7 than in presence of Gag alone and ultimately more viral release would take place.

References

- Azoulay, J., J. P. Clamme, et al. (2003). "Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations." J Mol Biol **326**(3): 691-700.
- Beltz, H., J. Azoulay, et al. (2003). "Impact of the terminal bulges of HIV-1 cTAR DNA on its stability and the destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7." J Mol Biol **328**(1): 95-108.
- Bernacchi, S. and Y. Mely (2001). "Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure." Nucleic Acids Res **29**(13): E62-62.
- Boudier, C., R. Storchak, et al. (2010). "The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription." J Mol Biol **400**(3): 487-501.
- Campbell, S. and A. Rein (1999). "In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain." J Virol **73**(3): 2270-2279.
- Cen, S., A. Khorchid, et al. (2000). "Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(22): 10796-10800.
- Cimarelli, A., S. Sandin, et al. (2000). "Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA." J Virol **74**(7): 3046-3057.
- Cristofari, G. and J. L. Darlix (2002). "The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **72**: 223-268.
- Cruceanu, M., M. A. Urbaneja, et al. (2006). "Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins." Nucleic Acids Res **34**(2): 593-605.
- D'Souza, V. and M. F. Summers (2005). "How retroviruses select their genomes." Nat Rev Microbiol **3**(8): 643-655.
- Dieci, G., L. Bottarelli, et al. (2000). "tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins." Protein Expr Purif **18**(3): 346-354.

- Egele, C., E. Piemont, et al. (2007). "The single-finger nucleocapsid protein of moloney murine leukemia virus binds and destabilizes the TAR sequences of HIV-1 but does not promote efficiently their annealing." Biochemistry **46**(50): 14650-14662.
- Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology **251**(1): 1-15.
- Godet, J., H. de Rocquigny, et al. (2006). "During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem." J Mol Biol **356**(5): 1180-1192.
- Godet, J. and Y. Mely (2010). "Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein." RNA Biol **7**(6): 687-699.
- McKinstry, W. J., M. Hijnen, et al. (2014). "Expression and purification of soluble recombinant full length HIV-1 Pr55(Gag) protein in Escherichia coli." Protein Expr Purif **100**: 10-18.
- Mekdad, H. E., E. Boutant, et al. (2016). "Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling." Retrovirology **13**(1): 54.
- Rein, A. (2010). "Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins." RNA Biol **7**(6): 700-705.
- Rein, A., S. A. Datta, et al. (2011). "Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs." Trends Biochem Sci **36**(7): 373-380.
- Sharma, K., P. Didier, et al. (2010). "Kinetic analysis of the nucleic acid chaperone activity of the hepatitis C virus core protein." Nucleic Acids Res **38**(11): 3632-3642.
- Stoylov, S. P. (2007). "Electro-optical investigations of the dipole moments of nanoparticles." Colloids Surf B Biointerfaces **56**(1-2): 50-58.
- Summers, M. F. and J. Karn (2011). "Special issue: Structural and molecular biology of HIV." J Mol Biol **410**(4): 489-490.
- Vogt, V. M. (1997). Retroviral Virions and Genomes. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY).
- Wang, S. W. and A. Aldovini (2002). "RNA incorporation is critical for retroviral particle integrity after cell membrane assembly of Gag complexes." J Virol **76**(23): 11853-11865.

- Wang, W., N. Naiyer, et al. (2014). "Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein precursor NCp15 explain reduced viral infectivity." Nucleic Acids Res **42**(11): 7145-7159.
- Wu, T., S. A. Datta, et al. (2010). "Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications." Virology **405**(2): 556-567.
- Xing, L., C. Liang, et al. (2011). "Coordinate roles of Gag and RNA helicase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA." J Virol **85**(4): 1847-1860.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

La polyprotéine Gag du VIH-1, le composant essentiel du virus, orchestre les étapes tardives du cycle viral (assemblage, dimérisation et encapsidation de l'ARN génomique viral). Cette protéine comporte plusieurs domaines notamment celui de la nucléocapside (NC). Ce domaine joue un rôle essentiel dans l'interaction avec les acides nucléiques, dans la sélection de l'ARN génomique viral et sa dimérisation initiant probablement son encapsidation spécifique. Cette dimérisation de l'ARN viral nécessite l'activité chaperonne des acides nucléiques de la NC. Au laboratoire, plusieurs tests *in vitro* ont permis de déchiffrer cette fonction de chaperonne permettant à la NCp7 d'hybrider deux oligonucléotides complémentaires (232,233). Le modèle actuel souligne que les motifs dactyles permettraient l'ouverture des structures nucléotidiques, au niveau des tiges ou des boucles et que les acides aminés basiques faciliteraient, par l'écrantage des charges, le rapprochement des oligonucléotides. Par ailleurs, plusieurs dérivés de la NCp7 ont été testés pour cette activité tels que la NCp15 et la NCp9 (102). Ces études ont montré que la NCp9 est plus active que la NCp7 et la NCp15 ce qui permet de suggérer que l'activité de la NCp9 repose sur la présence des doigts de zinc et du peptide SP2. Enfin, plusieurs études *in vitro* ont montré que GagΔp6 possédait une activité chaperonne des acides nucléiques via son domaine NC mais que cette activité semblait moins efficace que celle de la NCp7 mature (102,247,285,286).

Sachant que l'activité chaperonne de Gag est indispensable à la formation des particules virales nous avons émis l'hypothèse que Gag puisse recruter un partenaire cellulaire qui serait capable d'améliorer l'activité de Gag sur l'ARN génomique lors de la formation de la particule virale.

Pour cela, nous avons eu accès à une liste de protéines interagissant avec Gag et nous nous sommes intéressés à la RPL7. Cette protéine de la grande sous-unité ribosomale, interagit avec les ARN, notamment avec les ARN viraux (203), et pourrait, à l'instar des protéines ribosomales bactériennes, posséder une activité chaperonne des acides nucléiques. Nous avons confirmé l'interaction par des tests double hybride, par co-immunoprécipitation et par

deux méthodes de biophysiques, l'anisotropie de fluorescence et la DLS. De plus, nous avons pu montrer que les domaines N et C terminaux de la RPL7 sont nécessaires pour interagir avec GagNC. Il nous faudrait maintenant déterminer la structure 3D du complexe, notamment par RMN. Pour cela, nous disposons au laboratoire de la NCp7 et de nombreux peptides correspondant à différents domaines de la NC. Du côté de la RPL7, nous pourrions synthétiser les parties N et C terminales, qui contiennent une cinquantaine de résidus en utilisant la technique de SPPS.

Pour caractériser la fonction du complexe, j'ai purifié les deux protéines et, en me basant sur un test développé par notre équipe, j'ai montré, pour la première fois, que la RPL7 humaine est capable de catalyser l'hybridation de cTAR/dTAR ou de cTAR/TAR (ADN/ARN). Cette protéine possède donc une activité de chaperonne des acides nucléiques qui est par ailleurs supérieur à celle de Gag. De manière intéressante, j'ai pu démontrer que le complexe Gag-RPL7 possède une activité chaperonne plus efficace que celle obtenue pour chacune des protéines.

Ces différents niveaux d'efficacité pourraient être liés à des mécanismes d'activité de chaperonne différents. Dans le cas de la RPL7, l'hybridation cTAR/dTAR passe par la formation du complexe intermédiaire, obtenu par deux voies parallèles qui est ensuite transformer en complexe étendu. L'utilisation de différentes séquences oligonucléotidiques semble montrer que cette hybridation passe essentiellement par les tiges. Ces résultats sont proches de ceux trouvés avec le peptide E de la protéine core du virus HCV même si les constantes calculées montrent que la RPL7 est plus efficace (279).

Dans le cas de Gag, le complexe intermédiaire est formé rapidement selon une seule voie (et non deux pour la RPL7) suivi d'une conversion lente du complexe intermédiaire en complexe étendu. L'analyse des mutants montre une diminution de la vitesse réactionnelle et des constantes de réaction suggérant que Gag hybride cTAR à dTAR selon un mécanisme passant par les tiges et les boucles (et non uniquement les tiges pour RPL7). Ce mécanisme de Gag est similaire à celui de la NCp7 mature pour le test cTAR/dTAR (233). De plus, la comparaison des conditions expérimentales nous permet de montrer qu'une seule molécule de Gag par oligonucléotide possède les mêmes propriétés cinétiques que quatre molécules de NCp7 par oligonucléotide. Ce rapport d'un à quatre entre Gag et la NCp7 peut probablement

s'expliquer par la différence d'acides aminés basiques. Enfin, j'ai testé l'activité de chaperonne du complexe, j'ai montré que Gag-RPL7 hybride cTAR à dTAR selon un mécanisme à deux étapes suivant deux voies parallèles. De plus, il semble que les tiges et les boucles jouent un rôle dans cette d'hybridation. Ainsi, on remarque que le complexe Gag-RPL7 hybride cTAR/dTAR par deux étapes, comme la RPL7 mais en passant par les mêmes voies que Gag (tiges et boucles). Ce mécanisme empruntant la spécificité de chaque partenaire explique l'effet d'addition que nous avons observé et suggère que les deux protéines complexées collaborent permettant une activité chaperonne des acides nucléiques plus efficaces. Ainsi, l'ensemble de ces travaux nous a permis de confirmer le modèle proposé dans lequel Gag pourrait recruter la RPL7 afin d'augmenter son activité de chaperonne et en conséquence de favoriser l'encapsidation de l'ARN.

Or chez HIV, le même ARN est à la fois un ARN génomique dimérisé/encapsidé et un ARN messager traduit en protéine Gag. Par ailleurs, il a été décrit que la protéine Gag pouvait dans un premier temps stimuler puis inhiber sa propre traduction mais sans que le mécanisme ne soit décrit. Nous pourrions donc utiliser un test *in vitro* dans lequel la traduction d'un gène rapporteur serait suivie en présence de Gag, de RPL7 ou du complexe Gag-RPL7. Si le complexe Gag-RPL7 inhibait fortement la traduction alors nous pourrions suggérer qu'en recrutant la protéine cellulaire, Gag pourrait influencer l'équilibre traduction/encapsidation au profit de cette dernière. De plus, sachant que plusieurs protéines ribosomales possèdent une double activité chaperonne, des acides nucléiques et des protéines, comme les protéines L15, L16, L18 et L19 de la grande sous-unité ribosomale d'*E.coli* (287), il sera intéressant d'étudier par la technique de cristallographie ou de dichroïsme circulaire si la RPL7 induit une modification de la structure de Gag.

Dans un travail complémentaire, j'ai aussi testé l'activité de la protéine Gag sur d'autres oligonucléotides tels que PBS(+) et PBS(-) et comparé cette protéine à la protéine Gag délétée du domaine p6. Les résultats montrent que l'hybridation du (+)/(-)PBS en présence de Gag est similaire à celle trouvée dans le cas de cTAR/dTAR selon un mécanisme en deux étapes. Cependant, entre les deux tests *in vitro*, une différence importante existe à savoir que les séquences PBS sont hybridées par Gag uniquement par les boucles (et non tiges-boucles pour cTAR/dTAR). Ces résultats sont confirmés par la modification du rendement quantique des bases aminopurine (AP) localisées sur la boucle PBS en présence de Gag. De

plus, dans nos conditions expérimentales, la vitesse d'hybridation des séquences PBS(+) et PBS(-) se fait avec la même vitesse en présence d'une molécule de Gag ou d'une molécule de NCp7. Ces résultats montrent que Gag hybride les séquences PBS par une efficacité similaire à celle de la NCp7.

Dans la littérature, l'essentiel des travaux sur l'activité chaperonne de Gag est en fait développé avec la protéine GagΔp6. Nous avons donc utilisé les deux tests cTAR/dTAR et (+)/(-)PBS pour comparer cette protéine avec la protéine sauvage. L'hybridation de ces deux types d'oligonucléotides en présence de GagΔp6 montre une vitesse de réaction inférieure à celle de Gag sauvage. Dans le cas de cTAR /dTAR, la formation du complexe étendu se fait selon un mécanisme en deux étapes passant par les tiges uniquement (et non tiges et boucles pour Gag), ce qui montre le rôle de la présence du domaine p6 dans Gag dans l'hybridation via une interaction boucle-boucle. Dans le système (+)/(-)PBS l'hybridation se fait selon un mécanisme en deux étapes passant exclusivement par les extrémités protrudentes (et non boucle-boucle pour Gag). Cette différence de voies pourrait expliquer les cinétiques plus lentes observées dans le cas de GagΔp6. Tous ces résultats montrent pour la première fois que la présence du domaine p6 dans Gag oriente le mécanisme d'hybridation Gag dépendant vers une interaction boucle-boucle. De plus, l'efficacité de Gag pourrait résulter de la présence avec la protéine sauvage de deux formes de complexes intermédiaires contrairement à GagΔp6 où un seul complexe intermédiaire est observé.

Enfin, on peut imaginer qu'à la fin de l'étape d'assemblage, au moment du bourgeonnement, Gag puisse se comporter comme GagΔp6. En effet, Gag ne doit pas être très accessible car interagissant avec les membres de la famille ESCRT, avec Vpr, Vif... Cela pourrait se traduire par une diminution du potentiel de Gag dans sa fonction de chaperonne des acides nucléiques et renforcer l'idée du laboratoire de rechercher des partenaires recrutés par Gag, comme la RPL7, afin de restaurer ce potentiel.

Références

1. Montagnier, L., Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Vilmer, E., Rouzioux, C. *et al.* (1984) Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu symposia*, 15, 319-331.
2. Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (1997) In Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, H. E. (eds.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
3. Campbell, R.S. and Robinson, W.F. (1998) The comparative pathology of the lentiviruses. *J Comp Pathol*, 119, 333-395.
4. Vodicka, M.A. (2001) Determinants for lentiviral infection of non-dividing cells. *Somat Cell Mol Genet*, 26, 35-49.
5. Gottlieb, M.S. (2006) Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. *Am J Public Health*, 96, 980-981; discussion 982-983.
6. Friedman-Kien, A.E. (1981) Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol*, 5, 468-471.
7. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. *et al.* (2004) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin*, 56, 126-129.
8. Vahlne, A. (2009) A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology*, 6, 40.
9. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L. and Alizon, M. (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*, 324, 691-695.
10. Mourez, T., Simon, F. and Plantier, J.C. (2013) Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev*, 26, 448-461.
11. Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptue, L., Gurtler, L.G., McArthur, C.P., Devare, S.G. *et al.* (2010) Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 26, 109-115.
12. Roques, P., Robertson, D.L., Souquiere, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barre-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M. and Simon, F. (2004) Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*, 18, 1371-1381.
13. Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptue, L., Ndembi, N., Gurtler, L. *et al.* (2011) Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology*, 85, 1403-1407.
14. Reeves, J.D. and Doms, R.W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology*, 83, 1253-1265.
15. Boily, M.C., Baggaley, R.F. and Masse, B. (2009) The role of heterosexual anal intercourse for HIV transmission in developing countries: are we ready to draw conclusions? *Sex Transm Infect*, 85, 408-410.
16. Sleasman, J.W. and Goodenow, M.M. (2003) 13. HIV-1 infection. *J Allergy Clin Immunol*, 111, S582-592.
17. Cavarelli, M. and Scarlatti, G. (2011) Human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission and prevention: successes and controversies. *J Intern Med*, 270, 561-579.
18. Choi, W.T., Tian, S., Dong, C.Z., Kumar, S., Liu, D., Madani, N., An, J., Sodroski, J.G. and Huang, Z. (2005) Unique ligand binding sites on CXCR4 probed by a chemical biology approach: implications for the design of selective human immunodeficiency virus type 1 inhibitors. *Journal of virology*, 79, 15398-15404.
19. Kahn, J.O. and Walker, B.D. (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*, 339, 33-39.
20. Imami, N., Hardy, G., Pires, A., Burton, C., Pido-Lopez, J., Mela, C. and Gotch, F. (2002) Immune reconstitution in HIV-1-infected patients. *Curr Opin Investig Drugs*, 3, 1138-1145.

21. Roingeard, P. (2008) Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biology of the cell*, 100, 491-501.
22. Checkley, M.A., Luttge, B.G. and Freed, E.O. (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of molecular biology*, 410, 582-608.
23. Anderson, E.C. and Lever, A.M. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *Journal of virology*, 80, 10478-10486.
24. Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Jr., Sowder, R.C., 2nd, Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J. *et al.* (2006) Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of virology*, 80, 9039-9052.
25. Kleiman, L., Halwani, R. and Javanbakht, H. (2004) The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Current HIV research*, 2, 163-175.
26. Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H. and Bieniasz, P.D. (2004) APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of virology*, 78, 12058-12061.
27. Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L. and Mouland, A.J. (2004) Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology*, 24, 2637-2648.
28. Bender, W. and Davidson, N. (1976) Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell*, 7, 595-607.
29. Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C.L. and Weeks, K.M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, 460, 711-716.
30. D'Souza, V. and Summers, M.F. (2005) How retroviruses select their genomes. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 643-655.
31. Rana, T.M. and Jeang, K.T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Archives of biochemistry and biophysics*, 365, 175-185.
32. Harrich, D., Ulich, C. and Gaynor, R.B. (1996) A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Journal of virology*, 70, 4017-4027.
33. Ulich, C., Harrich, D., Estes, P. and Gaynor, R.B. (1996) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication is enhanced by a combination of transdominant Tat and Rev proteins. *Journal of virology*, 70, 4871-4876.
34. Karn, J. (1999) Tackling Tat. *Journal of molecular biology*, 293, 235-254.
35. Klasens, B.I., Thiesen, M., Virtanen, A. and Berkhout, B. (1999) The ability of the HIV-1 AAUAAA signal to bind polyadenylation factors is controlled by local RNA structure. *Nucleic acids research*, 27, 446-454.
36. Spriggs, S., Garyu, L., Connor, R. and Summers, M.F. (2008) Potential intra- and intermolecular interactions involving the unique-5' region of the HIV-1 5'-UTR. *Biochemistry*, 47, 13064-13073.
37. Kleiman, L. (2002) tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB life*, 53, 107-114.
38. Sundquist, W.I. and Krausslich, H.G. (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2, a006924.
39. Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1994) Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4945-4949.
40. Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. and Mak, J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature reviews. Microbiology*, 2, 461-472.
41. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. and Sodroski, J. (1989) Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *Journal of virology*, 63, 4085-4087.

42. Fernandes, J., Jayaraman, B. and Frankel, A. (2012) The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA biology*, 9, 6-11.
43. Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M.C., Allen, T.D. and Charneau, P. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal*, 26, 3025-3037.
44. Riviere, L., Darlix, J.L. and Cimarelli, A. (2010) Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *Journal of virology*, 84, 729-739.
45. Reicin, A.S., Kalpana, G., Paik, S., Marmon, S. and Goff, S. (1995) Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *Journal of virology*, 69, 5904-5907.
46. Larrouy, L., Chazallon, C., Landman, R., Capitant, C., Peytavin, G., Collin, G., Charpentier, C., Storto, A., Pialoux, G., Katlama, C. *et al.* (2010) Gag mutations can impact virological response to dual-boosted protease inhibitor combinations in antiretroviral-naïve HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 2910-2919.
47. Garcia, J.A., Ou, S.H., Wu, F., Lusi, A.J., Sparkes, R.S. and Gaynor, R.B. (1992) Cloning and chromosomal mapping of a human immunodeficiency virus 1 "TATA" element modulatory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9372-9376.
48. Siekevitz, M., Josephs, S.F., Dukovich, M., Pfeffer, N., Wong-Staal, F. and Greene, W.C. (1987) Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science*, 238, 1575-1578.
49. Freed, E.O. (2001) HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*, 26, 13-33.
50. Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K.K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Duportail, G. and Mely, Y. (2011) Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. *Nucleic acids research*, 39, 6633-6645.
51. Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 331, 280-283.
52. Moulard, M. and Decroly, E. (2000) Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et biophysica acta*, 1469, 121-132.
53. Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A. and Roux, K.H. (2003) Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15812-15817.
54. Martins, A.N., Waheed, A.A., Ablan, S.D., Huang, W., Newton, A., Petropoulos, C.J., Brindeiro, R.D. and Freed, E.O. (2015) Elucidation of the Molecular Mechanism Driving Duplication of the HIV-1 PTAP Late Domain. *Journal of virology*, 90, 768-779.
55. Abbas, W. and Herbein, G. (2014) Plasma membrane signaling in HIV-1 infection. *Biochimica et biophysica acta*, 1838, 1132-1142.
56. Prabakaran, P., Dimitrov, A.S., Fouts, T.R. and Dimitrov, D.S. (2007) Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Advances in pharmacology*, 55, 33-97.
57. Hartley, C.A., Gilbert, M.J., Brigido, L., Elbeik, T., Levy, J.A., Crowe, S.M. and Mills, J. (1996) Human immunodeficiency virus grown in CD4-expressing cells is associated with CD4. *The Journal of general virology*, 77 (Pt 9), 2015-2023.
58. Freed, E.O. (2015) HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature reviews. Microbiology*, 13, 484-496.
59. Saad, J.S., Loeliger, E., Luncsford, P., Liriano, M., Tai, J., Kim, A., Miller, J., Joshi, A., Freed, E.O. and Summers, M.F. (2007) Point mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. *Journal of molecular biology*, 366, 574-585.

60. Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H. and Summers, M.F. (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 11364-11369.
61. Ghanam, R.H., Samal, A.B., Fernandez, T.F. and Saad, J.S. (2012) Role of the HIV-1 Matrix Protein in Gag Intracellular Trafficking and Targeting to the Plasma Membrane for Virus Assembly. *Frontiers in microbiology*, 3, 55.
62. 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.
63. Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C.T., Sodroski, J. and Gottlinger, H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 372, 363-365.
64. Braaten, D. and Luban, J. (2001) Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *The EMBO journal*, 20, 1300-1309.
65. Grattinger, M., Hohenberg, H., Thomas, D., Wilk, T., Muller, B. and Krausslich, H.G. (1999) In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology*, 257, 247-260.
66. Lingappa, J.R., Reed, J.C., Tanaka, M., Chutiraka, K. and Robinson, B.A. (2014) How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. *Virus research*, 193, 89-107.
67. Schaller, T., Ocwieja, K.E., Rasaiyaah, J., Price, A.J., Brady, T.L., Roth, S.L., Hue, S., Fletcher, A.J., Lee, K., KewalRamani, V.N. et al. (2011) HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS pathogens*, 7, e1002439.
68. Mirambeau, G., Lonnais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J., Borde, I., Reboud-Ravaux, M., Restle, T., Gorelick, R.J. et al. (2007) HIV-1 protease and reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. *PLoS one*, 2, e669.
69. Mely, Y., De Rocquigny, H., Morellet, N., Roques, B.P. and Gerad, D. (1996) Zinc binding to the HIV-1 nucleocapsid protein: a thermodynamic investigation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 35, 5175-5182.
70. Berg, J.M. (1986) Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science*, 232, 485-487.
71. Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1992) Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *The EMBO journal*, 11, 3059-3065.
72. Morellet, N., de Rocquigny, H., Mely, Y., Jullian, N., Demene, H., Ottmann, M., Gerard, D., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1994) Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR. *Journal of molecular biology*, 235, 287-301.
73. Thomas, J.A. and Gorelick, R.J. (2008) Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus research*, 134, 39-63.
74. Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., Jr., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., 3rd, Hare, D.R. et al. (1992) Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 1, 563-574.
75. Tanchou, V., Decimo, D., Pechoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M. and Darlix, J.L. (1998) Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication. *Journal of virology*, 72, 4442-4447.
76. Demene, H., Jullian, N., Morellet, N., de Rocquigny, H., Cornille, F., Maigret, B. and Roques, B.P. (1994) Three-dimensional 1H NMR structure of the nucleocapsid protein NCp10 of Moloney murine leukemia virus. *J Biomol NMR*, 4, 153-170.

77. Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A. and Gottlinger, H.G. (1993) Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Journal of virology*, 67, 6159-6169.
78. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. and Summers, M.F. (1998) Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science*, 279, 384-388.
79. Bourbigot, S., Ramalanjaona, N., Boudier, C., Salgado, G.F., Roques, B.P., Mely, Y., Bouaziz, S. and Morellet, N. (2008) How the HIV-1 nucleocapsid protein binds and destabilises the (-)primer binding site during reverse transcription. *Journal of molecular biology*, 383, 1112-1128.
80. Bazzi, A., Zargarian, L., Chaminade, F., Boudier, C., De Rocquigny, H., Rene, B., Mely, Y., Fosse, P. and Mauffret, O. (2011) Structural insights into the cTAR DNA recognition by the HIV-1 nucleocapsid protein: role of sugar deoxyriboses in the binding polarity of NC. *Nucleic acids research*, 39, 3903-3916.
81. Darlix, J.L., de Rocquigny, H., Mauffret, O. and Mely, Y. (2014) Retrospective on the all-in-one retroviral nucleocapsid protein. *Virus research*, 193, 2-15.
82. Hagan, N.A. and Fabris, D. (2007) Dissecting the protein-RNA and RNA-RNA interactions in the nucleocapsid-mediated dimerization and isomerization of HIV-1 stemloop 1. *Journal of molecular biology*, 365, 396-410.
83. Maki, A.H., Ozarowski, A., Misra, A., Urbaneja, M.A. and Casas-Finet, J.R. (2001) Phosphorescence and optically detected magnetic resonance of HIV-1 nucleocapsid protein complexes with stem-loop sequences of the genomic Psi-recognition element. *Biochemistry*, 40, 1403-1412.
84. Vuilleumier, C., Bombarda, E., Morellet, N., Gerard, D., Roques, B.P. and Mely, Y. (1999) Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry*, 38, 16816-16825.
85. Fisher, R.J., Rein, A., Fivash, M., Urbaneja, M.A., Casas-Finet, J.R., Medaglia, M. and Henderson, L.E. (1998) Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *Journal of virology*, 72, 1902-1909.
86. Mely, Y., de Rocquigny, H., Sorinas-Jimeno, M., Keith, G., Roques, B.P., Marquet, R. and Gerard, D. (1995) Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA(3Lys), in vitro, is essentially not specific. *The Journal of biological chemistry*, 270, 1650-1656.
87. D'Souza, V., Dey, A., Habib, D. and Summers, M.F. (2004) NMR structure of the 101-nucleotide core encapsidation signal of the Moloney murine leukemia virus. *Journal of molecular biology*, 337, 427-442.
88. Avilov, S.V., Godet, J., Piemont, E. and Mely, Y. (2009) Site-specific characterization of HIV-1 nucleocapsid protein binding to oligonucleotides with two binding sites. *Biochemistry*, 48, 2422-2430.
89. Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Chancellor, K.J., Wu, Z.R. and Summers, M.F. (2000) NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *Journal of molecular biology*, 301, 491-511.
90. Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F. and Barre-Sinoussi, F. (1990) Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of molecular biology*, 216, 689-699.
91. Clever, J., Sassetti, C. and Parslow, T.G. (1995) RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 69, 2101-2109.
92. Clever, J.L., Mirandar, D., Jr. and Parslow, T.G. (2002) RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *Journal of virology*, 76, 12381-12387.

93. Sakaguchi, K., Zambrano, N., Baldwin, E.T., Shapiro, B.A., Erickson, J.W., Omichinski, J.G., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. and Appella, E. (1993) Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 5219-5223.
94. Krishnamoorthy, G., Duportail, G. and Mely, Y. (2002) Structure and dynamics of condensed DNA probed by 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-diazaundecamethylene)bis[4-[[3- methylbenz-1,3-oxazol-2-yl]methylidene]-1,4-dihydroquinolinium] tetraiodide fluorescence. *Biochemistry*, 41, 15277-15287.
95. Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H., Van Gent, D., Roques, B., Plasterk, R. and Darlix, J.L. (1993) Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic acids research*, 21, 831-839.
96. Abd El-Wahab, E.W., Smyth, R.P., Mailler, E., Bernacchi, S., Vivet-Boudou, V., Hijnen, M., Jossinet, F., Mak, J., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2014) Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. *Nature communications*, 5, 4304.
97. VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. and Carter, C.A. (2001) Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 7724-7729.
98. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114, 689-699.
99. Bachand, F., Yao, X.J., Hrimech, M., Rougeau, N. and Cohen, E.A. (1999) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *The Journal of biological chemistry*, 274, 9083-9091.
100. Datta, S.A., Clark, P.K., Fan, L., Ma, B., Harvin, D.P., Sowder, R.C., 2nd, Nussinov, R., Wang, Y.X. and Rein, A. (2015) Dimerization of the SP1 Region of HIV-1 Gag Induces a Helical Conformation and Association into Helical Bundles: Implications for Particle Assembly. *Journal of virology*, 90, 1773-1787.
101. de Marco, A., Heuser, A.M., Glass, B., Krausslich, H.G., Muller, B. and Briggs, J.A. (2012) Role of the SP2 domain and its proteolytic cleavage in HIV-1 structural maturation and infectivity. *Journal of virology*, 86, 13708-13716.
102. Wang, W., Naiyer, N., Mitra, M., Li, J., Williams, M.C., Rouzina, I., Gorelick, R.J., Wu, Z. and Musier-Forsyth, K. (2014) Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein precursor NCp15 explain reduced viral infectivity. *Nucleic acids research*, 42, 7145-7159.
103. Gottlinger, H.G. (2001) The HIV-1 assembly machine. *AIDS*, 15 Suppl 5, S13-20.
104. Pettit, S.C., Simsic, J., Loeb, D.D., Everitt, L., Hutchison, C.A., 3rd and Swanstrom, R. (1991) Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. *The Journal of biological chemistry*, 266, 14539-14547.
105. Kaplan, A.H., Manchester, M. and Swanstrom, R. (1994) The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *Journal of virology*, 68, 6782-6786.
106. Michel, F., Crucifix, C., Granger, F., Eiler, S., Mouscadet, J.F., Korolev, S., Agapkina, J., Ziganshin, R., Gottikh, M., Nazabal, A. *et al.* (2009) Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *The EMBO journal*, 28, 980-991.
107. Delelis, O., Carayon, K., Saib, A., Deprez, E. and Mouscadet, J.F. (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*, 5, 114.
108. Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R. and Bushman, F. (2005) A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nature medicine*, 11, 1287-1289.
109. Gotte, M., Rausch, J.W., Marchand, B., Sarafianos, S. and Le Grice, S.F. (2010) Reverse transcriptase in motion: conformational dynamics of enzyme-substrate interactions. *Biochimica et biophysica acta*, 1804, 1202-1212.

110. Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256, 1783-1790.
111. Anastassopoulou, C.G. and Kostrikis, L.G. (2006) Global genetic variation of HIV-1 infection. *Current HIV research*, 4, 365-373.
112. Musinova, Y.R., Sheval, E.V., Dib, C., Germini, D. and Vassetzky, Y.S. (2016) Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73, 589-601.
113. Grewe, B., Ehrhardt, K., Hoffmann, B., Blissenbach, M., Brandt, S. and Uberla, K. (2012) The HIV-1 Rev protein enhances encapsidation of unspliced and spliced, RRE-containing lentiviral vector RNA. *PLoS one*, 7, e48688.
114. Paxton, W., Connor, R.I. and Landau, N.R. (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *Journal of virology*, 67, 7229-7237.
115. Zhang, S., Pointer, D., Singer, G., Feng, Y., Park, K. and Zhao, L.J. (1998) Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene*, 212, 157-166.
116. Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. and Krausslich, H.G. (2000) Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 74, 1168-1177.
117. Kotov, A., Zhou, J., Flicker, P. and Aiken, C. (1999) Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *Journal of virology*, 73, 8824-8830.
118. Campbell, E.M., Nunez, R. and Hope, T.J. (2004) Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *Journal of virology*, 78, 5745-5755.
119. Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C. and Cullen, B.R. (1993) Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *The Journal of experimental medicine*, 177, 1561-1566.
120. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine*, 2, 338-342.
121. Yang, O.O., Nguyen, P.T., Kalams, S.A., Dorfman, T., Gottlinger, H.G., Stewart, S., Chen, I.S., Threlkeld, S. and Walker, B.D. (2002) Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology*, 76, 1626-1631.
122. Trautz, B., Pierini, V., Wombacher, R., Stolp, B., Chase, A.J., Pizzato, M. and Fackler, O.T. (2016) The Antagonism of HIV-1 Nef to SERINC5 Particle Infectivity Restriction Involves the Counteraction of Virion-Associated Pools of the Restriction Factor. *Journal of virology*, 90, 10915-10927.
123. Henriët, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.C. and Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *Journal of molecular biology*, 354, 55-72.
124. Bouyac, M., Courcoul, M., Bertoia, G., Baudat, Y., Gabuzda, D., Blanc, D., Chazal, N., Boulanger, P., Sire, J., Vigne, R. et al. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *Journal of virology*, 71, 9358-9365.
125. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C. and Malim, M.H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature medicine*, 9, 1404-1407.
126. Henriët, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R.J., Marquet, R. and Paillart, J.C. (2007) Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic acids research*, 35, 5141-5153.
127. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. and Wain-Hobson, S. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, 345, 356-359.
128. Bour, S., Geleziunas, R. and Wainberg, M.A. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological reviews*, 59, 63-93.

129. Neil, S.J., Zang, T. and Bieniasz, P.D. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451, 425-430.
130. Van Damme, N. and Guatelli, J. (2008) HIV-1 Vpu inhibits accumulation of the envelope glycoprotein within clathrin-coated, Gag-containing endosomes. *Cellular microbiology*, 10, 1040-1057.
131. Barre-Sinoussi, F., Ross, A.L. and Delfraissy, J.F. (2013) Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature reviews. Microbiology*, 11, 877-883.
132. Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. and Hendrickson, W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393, 648-659.
133. Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clement, J.F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M. *et al.* (2010) Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci*, 123, 369-383.
134. Connell, B.J. and Lortat-Jacob, H. (2013) Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition. *Frontiers in immunology*, 4, 385.
135. Bampi, C., Bibillo, A., Wendeler, M., Divita, G., Gorelick, R.J., Le Grice, S.F. and Darlix, J.L. (2006) Nucleotide excision repair and template-independent addition by HIV-1 reverse transcriptase in the presence of nucleocapsid protein. *The Journal of biological chemistry*, 281, 11736-11743.
136. Grohmann, D., Godet, J., Mely, Y., Darlix, J.L. and Restle, T. (2008) HIV-1 nucleocapsid traps reverse transcriptase on nucleic acid substrates. *Biochemistry*, 47, 12230-12240.
137. Sharma, P.L., Nurpeisov, V., Hernandez-Santiago, B., Beltran, T. and Schinazi, R.F. (2004) Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Curr Top Med Chem*, 4, 895-919.
138. Farnet, C.M. and Bushman, F.D. (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*, 88, 483-492.
139. Chen, H. and Engelman, A. (1998) The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15270-15274.
140. Sherman, M.P. and Greene, W.C. (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4, 67-73.
141. Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. (1991) HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*, 67, 1211-1221.
142. Yoder, K.E. and Bushman, F.D. (2000) Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *Journal of virology*, 74, 11191-11200.
143. Hindmarsh, P., Ridky, T., Reeves, R., Andrade, M., Skalka, A.M. and Leis, J. (1999) HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *Journal of virology*, 73, 2994-3003.
144. Pandey, K.K., Sinha, S. and Grandgenett, D.P. (2007) Transcriptional coactivator LEDGF/p75 modulates human immunodeficiency virus type 1 integrase-mediated concerted integration. *Journal of virology*, 81, 3969-3979.
145. Carteau, S., Gorelick, R.J. and Bushman, F.D. (1999) Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein. *Journal of virology*, 73, 6670-6679.
146. Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S. and Meyerhans, A. (2002) Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, 418, 144.
147. Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. and Bushman, F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110, 521-529.
148. Arts, E.J. and Hazuda, D.J. (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2, a007161.
149. Gatignol, A. (2007) Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Advances in pharmacology*, 55, 137-159.

150. Parada, C.A. and Roeder, R.G. (1996) Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature*, 384, 375-378.
151. Schwartz, S., Felber, B.K., Fenyo, E.M. and Pavlakis, G.N. (1990) Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology*, 64, 5448-5456.
152. Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M.I. and Giacca, M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13519-13524.
153. Malim, M.H., Tiley, L.S., McCarn, D.F., Rusche, J.R., Hauber, J. and Cullen, B.R. (1990) HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell*, 60, 675-683.
154. Pollard, V.W. and Malim, M.H. (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology*, 52, 491-532.
155. Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2007) Translational control of retroviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 128-140.
156. Herbreteau, C.H., Weill, L., Decimo, D., Prevot, D., Darlix, J.L., Sargueil, B. and Ohlmann, T. (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nature structural & molecular biology*, 12, 1001-1007.
157. De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B. and Darlix, J.L. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6472-6476.
158. El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mely, Y. and de Rocquigny, H. (2015) Role of the Nucleocapsid Domain in HIV-1 Gag Oligomerization and Trafficking to the Plasma Membrane: A Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Investigation. *Journal of molecular biology*, 427, 1480-1494.
159. Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P. and Thali, M. (2003) HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic*, 4, 902-910.
160. Ono, A. and Freed, E.O. (2004) Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *Journal of virology*, 78, 1552-1563.
161. Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E. and Freed, E.O. (2008) Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS pathogens*, 4, e1000015.
162. Hamard-Peron, E. and Muriaux, D. (2011) Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology*, 8, 15.
163. Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S.M. and Mak, J. (2001) Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *Journal of virology*, 75, 1834-1841.
164. Shehu-Xhilaga, M., Hill, M., Marshall, J.A., Kappes, J., Crowe, S.M. and Mak, J. (2002) The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *Journal of virology*, 76, 4331-4340.
165. Swanson, C.M. and Malim, M.H. (2008) SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*, 133, 742, 742 e741.
166. Wolf, D. and Goff, S.P. (2008) Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annual review of genetics*, 42, 143-163.
167. Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, P., Darlix, J.L. and Muriaux, D. (2008) [Revisiting HIV-1 assembly]. *Medecine sciences : M/S*, 24, 49-55.
168. Marsh, M. and Thali, M. (2003) HIV's great escape. *Nature medicine*, 9, 1262-1263.
169. Irie, T. (2010) [Envelope virus assembly and budding]. *Uirusu*, 60, 105-113.
170. Popova, E., Popov, S. and Gottlinger, H.G. (2010) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p1 confers ESCRT pathway dependence. *Journal of virology*, 84, 6590-6597.

171. Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoude, G., Jadwin, J.A., de La Cruz, J., Nagashima, K. and Bouamr, F. (2009) The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS pathogens*, 5, e1000339.
172. Prescher, J., Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Torrano, A.A., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D.C. (2015) Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites. *PLoS pathogens*, 11, e1004677.
173. Briggs, J.A. and Krausslich, H.G. (2011) The molecular architecture of HIV. *Journal of molecular biology*, 410, 491-500.
174. Bukrinskaya, A.G. (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology*, 149, 1067-1082.
175. Saadatmand, J., Niu, M., Kleiman, L. and Guo, F. (2009) The contribution of the primer activation signal to differences between Gag- and NCp7-facilitated tRNA(Lys3) annealing in HIV-1. *Virology*, 391, 334-341.
176. Saadatmand, J. and Kleiman, L. (2012) Aspects of HIV-1 assembly that promote primer tRNA(Lys3) annealing to viral RNA. *Virus research*, 169, 340-348.
177. Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K. et al. (2012) Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*, 481, 365-370.
178. Le Sage, V., Cinti, A., Valiente-Echeverria, F. and Mouland, A.J. (2015) Proteomic analysis of HIV-1 Gag interacting partners using proximity-dependent biotinylation. *Virology journal*, 12, 138.
179. Huang, B., Zhou, H., Lang, X. and Liu, Z. (2014) siRNA-induced ABCE1 silencing inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 10, 1685-1690.
180. Tian, Y., Tian, X., Han, X., Chen, Y., Song, C.Y., Jiang, W.J. and Tian, D.L. (2016) ABCE1 plays an essential role in lung cancer progression and metastasis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37, 8375-8382.
181. Karcher, A., Schele, A. and Hopfner, K.P. (2008) X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *The Journal of biological chemistry*, 283, 7962-7971.
182. Abbink, T.E. and Berkhout, B. (2007) HIV-1 reverse transcription: close encounters between the viral genome and a cellular tRNA. *Advances in pharmacology*, 55, 99-135.
183. Tian, Y., Han, X. and Tian, D.L. (2012) The biological regulation of ABCE1. *IUBMB life*, 64, 795-800.
184. Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C. and Lingappa, J.R. (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*, 415, 88-92.
185. Lingappa, J.R., Dooher, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K. and Klein, K.C. (2006) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *The Journal of biological chemistry*, 281, 3773-3784.
186. Gardiol, A. and St Johnston, D. (2014) Staufer targets coracle mRNA to Drosophila neuromuscular junctions and regulates GluRIIA synaptic accumulation and bouton number. *Developmental biology*, 392, 153-167.
187. Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L. and Cohen, E.A. (2000) The double-stranded RNA-binding protein Staufer is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *Journal of virology*, 74, 5441-5451.
188. Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J. and DesGroseillers, L. (2008) The host protein Staufer1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*, 5, 41.
189. Engeland, C.E., Oberwinkler, H., Schumann, M., Krause, E., Muller, G.A. and Krausslich, H.G. (2011) The cellular protein Ilyc interacts with HIV-1 Gag. *Journal of virology*, 85, 13322-13332.
190. Liu, B., Dai, R., Tian, C.J., Dawson, L., Gorelick, R. and Yu, X.F. (1999) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *Journal of virology*, 73, 2901-2908.
191. Sette, P., Dussupt, V. and Bouamr, F. (2012) Identification of the HIV-1 NC binding interface in Alix Bro1 reveals a role for RNA. *Journal of virology*, 86, 11608-11615.

192. Dussupt, V., Sette, P., Bello, N.F., Javid, M.P., Nagashima, K. and Bouamr, F. (2011) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *Journal of virology*, 85, 2304-2315.
193. Pickering, B.F., Yu, D. and Van Dyke, M.W. (2011) Nucleolin protein interacts with microprocessor complex to affect biogenesis of microRNAs 15a and 16. *The Journal of biological chemistry*, 286, 44095-44103.
194. Studamire, B. and Goff, S.P. (2008) Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors. *Retrovirology*, 5, 48.
195. Haque, A. and Mir, M.A. (2010) Interaction of hantavirus nucleocapsid protein with ribosomal protein S19. *Journal of virology*, 84, 12450-12453.
196. Beyer, A.R., Bann, D.V., Rice, B., Pultz, I.S., Kane, M., Goff, S.P., Golovkina, T.V. and Parent, L.J. (2013) Nucleolar trafficking of the mouse mammary tumor virus gag protein induced by interaction with ribosomal protein L9. *Journal of virology*, 87, 1069-1082.
197. He, X., Li, Y., Dai, M.S. and Sun, X.X. (2016) Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop. *Oncotarget*, 7, 16217-16226.
198. Robledo, S., Idol, R.A., Crimmins, D.L., Ladenson, J.H., Mason, P.J. and Bessler, M. (2008) The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna*, 14, 1918-1929.
199. Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M. and Yusupova, G. (2013) New structural insights into the decoding mechanism: translation infidelity via a G.U pair with Watson-Crick geometry. *FEBS letters*, 587, 1848-1857.
200. Xu, X., Xiong, X. and Sun, Y. (2016) The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Science China. Life sciences*, 59, 656-672.
201. Ko, J.R., Wu, J.Y., Kirby, R., Li, I.F. and Lin, A. (2006) Mapping the essential structures of human ribosomal protein L7 for nuclear entry, ribosome assembly and function. *FEBS letters*, 580, 3804-3810.
202. Neumann, F., Hemmerich, P., von Mikecz, A., Peter, H.H. and Krawinkel, U. (1995) Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic acids research*, 23, 195-202.
203. Hemmerich, P., Bosbach, S., von Mikecz, A. and Krawinkel, U. (1997) Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *European journal of biochemistry*, 245, 549-556.
204. Khachatoorian, R. and French, S.W. (2016) Chaperones in hepatitis C virus infection. *World J Hepatol*, 8, 9-35.
205. Nyakundi, D.O., Vuko, L.A., Bentley, S.J., Hoppe, H., Blatch, G.L. and Boshoff, A. (2016) Plasmodium falciparum Hep1 Is Required to Prevent the Self Aggregation of PfHsp70-3. *PloS one*, 11, e0156446.
206. Tsuchiya, Y., Saito, M. and Kohno, K. (2016) Pathogenic Mechanism of Diabetes Development Due to Dysfunction of Unfolded Protein Response. *Yakugaku Zasshi*, 136, 817-825.
207. Herschlag, D. (1995) RNA chaperones and the RNA folding problem. *The Journal of biological chemistry*, 270, 20871-20874.
208. Lorsch, J.R. (2002) RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell*, 109, 797-800.
209. Cristofari, G. and Darlix, J.L. (2002) The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 72, 223-268.
210. Cech, G.M., Szalewska-Palasz, A., Kubiak, K., Malabirade, A., Grange, W., Arluison, V. and Wegrzyn, G. (2016) The Escherichia Coli Hfq Protein: An Unattended DNA-Transactions Regulator. *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 36.
211. Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 197-208.
212. Tompa, P. and Csermely, P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *Faseb J*, 18, 1169-1175.

213. Morellet, N., Demene, H., Teilleux, V., Huynh-Dinh, T., de Rocquigny, H., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1998) Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *Journal of molecular biology*, 283, 419-434.
214. Rajkowitsch, L. and Schroeder, R. (2007) Coupling RNA annealing and strand displacement: a FRET-based microplate reader assay for RNA chaperone activity. *Biotechniques*, 43, 304, 306, 308 passim.
215. Rajkowitsch, L., Semrad, K., Mayer, O. and Schroeder, R. (2005) Assays for the RNA chaperone activity of proteins. *Biochem Soc Trans*, 33, 450-456.
216. Azoulay, J., Clamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P. and Mely, Y. (2003) Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *Journal of molecular biology*, 326, 691-700.
217. Boudier, C., Humbert, N., Chaminade, F., Chen, Y., de Rocquigny, H., Godet, J., Mauffret, O., Fosse, P. and Mely, Y. (2014) Dynamic interactions of the HIV-1 Tat with nucleic acids are critical for Tat activity in reverse transcription. *Nucleic acids research*, 42, 1065-1078.
218. Boudier, C., Storchak, R., Sharma, K.K., Didier, P., Follenius-Wund, A., Muller, S., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2010) The mechanism of HIV-1 Tat-directed nucleic acid annealing supports its role in reverse transcription. *Journal of molecular biology*, 400, 487-501.
219. Godet, J., Boudier, C., Humbert, N., Ivanyi-Nagy, R., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2012) Comparative nucleic acid chaperone properties of the nucleocapsid protein NCp7 and Tat protein of HIV-1. *Virus research*, 169, 349-360.
220. Bolinger, C., Sharma, A., Singh, D., Yu, L. and Boris-Lawrie, K. (2010) RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. *Nucleic acids research*, 38, 1686-1696.
221. Sleiman, D., Bernacchi, S., Xavier Guerrero, S., Brachet, F., Larue, V., Paillart, J.C. and Tisne, C. (2014) Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein. Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA biology*, 11, 906-920.
222. Roy, C., Tounekti, N., Mougél, M., Darlix, J.L., Paoletti, C., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Paoletti, J. (1990) An analytical study of the dimerization of in vitro generated RNA of Moloney murine leukemia virus MoMuLV. *Nucleic acids research*, 18, 7287-7292.
223. Paillart, J.C., Berthoux, L., Ottmann, M., Darlix, J.L., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1996) A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *Journal of virology*, 70, 8348-8354.
224. Belisova, A., Semrad, K., Mayer, O., Kocian, G., Waigmann, E., Schroeder, R. and Steiner, G. (2005) RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *Rna*, 11, 1084-1094.
225. Semrad, K. (2011) Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochemistry research international*, 2011, 532908.
226. Prenninger, S., Schroeder, R. and Semrad, K. (2006) Assaying RNA chaperone activity in vivo in bacteria using a ribozyme folding trap. *Nature protocols*, 1, 1273-1277.
227. Hlavaty, J., Schittmayer, M., Stracke, A., Jandl, G., Knapp, E., Felber, B.K., Salmons, B., Gunzburg, W.H. and Renner, M. (2005) Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology*, 341, 1-11.
228. Wu, T., Gorelick, R.J. and Levin, J.G. (2014) Selection of fully processed HIV-1 nucleocapsid protein is required for optimal nucleic acid chaperone activity in reverse transcription. *Virus research*, 193, 52-64.
229. Wu, T., Datta, S.A., Mitra, M., Gorelick, R.J., Rein, A. and Levin, J.G. (2010) Fundamental differences between the nucleic acid chaperone activities of HIV-1 nucleocapsid protein and Gag or Gag-derived proteins: biological implications. *Virology*, 405, 556-567.
230. Beltz, H., Clauss, C., Piemont, E., Ficheux, D., Gorelick, R.J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J.L., de Rocquigny, H. and Mely, Y. (2005) Structural determinants of HIV-1 nucleocapsid protein for cTAR DNA binding and destabilization, and correlation with inhibition of self-primed DNA synthesis. *Journal of molecular biology*, 348, 1113-1126.

231. Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2002) HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of TAR and its complementary sequence. *Journal of molecular biology*, 317, 385-399.
232. Godet, J., de Rocquigny, H., Raja, C., Glasser, N., Ficheux, D., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2006) During the early phase of HIV-1 DNA synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the TAR complementary sequences via the ends of their double-stranded stem. *Journal of molecular biology*, 356, 1180-1192.
233. Godet, J. and Mely, Y. (2010) Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA biology*, 7, 687-699.
234. Ramalanjaona, N., de Rocquigny, H., Millet, A., Ficheux, D., Darlix, J.L. and Mely, Y. (2007) Investigating the mechanism of the nucleocapsid protein chaperoning of the second strand transfer during HIV-1 DNA synthesis. *Journal of molecular biology*, 374, 1041-1053.
235. Allain, B., Lapadat-Tapolsky, M., Berlioz, C. and Darlix, J.L. (1994) Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome. *The EMBO journal*, 13, 973-981.
236. De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B. and Darlix, J.L. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6472-6476.
237. Housset, V., De Rocquigny, H., Roques, B.P. and Darlix, J.L. (1993) Basic amino acids flanking the zinc finger of Moloney murine leukemia virus nucleocapsid protein NCp10 are critical for virus infectivity. *Journal of virology*, 67, 2537-2545.
238. Prats, A.C., Roy, C., Wang, P.A., Erard, M., Housset, V., Gabus, C., Paoletti, C. and Darlix, J.L. (1990) cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *Journal of virology*, 64, 774-783.
239. Godet, J., Kenfack, C., Przybilla, F., Richert, L., Duportail, G. and Mely, Y. (2013) Site-selective probing of cTAR destabilization highlights the necessary plasticity of the HIV-1 nucleocapsid protein to chaperone the first strand transfer. *Nucleic acids research*, 41, 5036-5048.
240. Cen, S., Khorchid, A., Gabor, J., Rong, L., Wainberg, M.A. and Kleiman, L. (2000) Roles of Pr55(gag) and NCp7 in tRNA(3)(Lys) genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 74, 10796-10800.
241. Williams, M.C., Gorelick, R.J. and Musier-Forsyth, K. (2002) Specific zinc-finger architecture required for HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8614-8619.
242. Kanevsky, I., Chaminade, F., Chen, Y., Godet, J., Rene, B., Darlix, J.L., Mely, Y., Mauffret, O. and Fosse, P. (2011) Structural determinants of TAR RNA-DNA annealing in the absence and presence of HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic acids research*, 39, 8148-8162.
243. Vo, M.N., Barany, G., Rouzina, I. and Musier-Forsyth, K. (2006) Mechanistic studies of mini-TAR RNA/DNA annealing in the absence and presence of HIV-1 nucleocapsid protein. *Journal of molecular biology*, 363, 244-261.
244. Cruceanu, M., Urbaneja, M.A., Hixson, C.V., Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J., Casas-Finet, J.R. et al. (2006) Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic acids research*, 34, 593-605.
245. Adamson, C.S. and Freed, E.O. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Advances in pharmacology*, 55, 347-387.
246. D'Souza, V. and Summers, M.F. (2004) Structural basis for packaging the dimeric genome of Moloney murine leukaemia virus. *Nature*, 431, 586-590.
247. Rein, A. (2010) Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA biology*, 7, 700-705.

248. Datta, S.A., Zhao, Z., Clark, P.K., Tarasov, S., Alexandratos, J.N., Campbell, S.J., Kvaratskhelia, M., Lebowitz, J. and Rein, A. (2007) Interactions between HIV-1 Gag molecules in solution: an inositol phosphate-mediated switch. *Journal of molecular biology*, 365, 799-811.
249. del Alamo, M., Neira, J.L. and Mateu, M.G. (2003) Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *The Journal of biological chemistry*, 278, 27923-27929.
250. Tedbury, P.R., Mercredi, P.Y., Gaines, C.R., Summers, M.F. and Freed, E.O. (2015) Elucidating the mechanism by which compensatory mutations rescue an HIV-1 matrix mutant defective for gag membrane targeting and envelope glycoprotein incorporation. *Journal of molecular biology*, 427, 1413-1427.
251. Vlach, J. and Saad, J.S. (2015) Structural and molecular determinants of HIV-1 Gag binding to the plasma membrane. *Frontiers in microbiology*, 6, 232.
252. Berkowitz, R.D., Ohagen, A., Hoglund, S. and Goff, S.P. (1995) Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *Journal of virology*, 69, 6445-6456.
253. Kaye, J.F. and Lever, A.M. (1998) Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *Journal of virology*, 72, 5877-5885.
254. Mangel, W.F., Delius, H. and Duesberg, P.H. (1974) Structure and molecular weight of the 60-70S RNA and the 30-40S RNA of the Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 4541-4545.
255. Levin, J.G., Grimley, P.M., Ramseur, J.M. and Berezesky, I.K. (1974) Deficiency of 60 to 70S RNA in murine leukemia virus particles assembled in cells treated with actinomycin D. *Journal of virology*, 14, 152-161.
256. Fu, W. and Rein, A. (1993) Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *Journal of virology*, 67, 5443-5449.
257. Song, R., Kafaie, J., Yang, L. and Laughrea, M. (2007) HIV-1 viral RNA is selected in the form of monomers that dimerize in a three-step protease-dependent process; the DIS of stem-loop 1 initiates viral RNA dimerization. *Journal of molecular biology*, 371, 1084-1098.
258. Houck-Loomis, B., Durney, M.A., Salguero, C., Shankar, N., Nagle, J.M., Goff, S.P. and D'Souza, V.M. (2011) An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding. *Nature*, 480, 561-564.
259. Jouvenet, N., Simon, S.M. and Bieniasz, P.D. (2009) Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 19114-19119.
260. Chen, J., Nikolaitchik, O., Singh, J., Wright, A., Bencsics, C.E., Coffin, J.M., Ni, N., Lockett, S., Pathak, V.K. and Hu, W.S. (2009) High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13535-13540.
261. Chen, J., Rahman, S.A., Nikolaitchik, O.A., Grunwald, D., Sardo, L., Burdick, R.C., Plisov, S., Liang, E., Tai, S., Pathak, V.K. et al. (2016) HIV-1 RNA genome dimerizes on the plasma membrane in the presence of Gag protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E201-208.
262. Ferrer, M., Clerte, C., Chamontin, C., Basyuk, E., Laine, S., Hottin, J., Bertrand, E., Margeat, E. and Mougel, M. (2016) Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. *Nucleic acids research*, 44, 7922-7934.
263. Rein, A., Datta, S.A., Jones, C.P. and Musier-Forsyth, K. (2011) Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends in biochemical sciences*, 36, 373-380.
264. Xing, L., Liang, C. and Kleiman, L. (2011) Coordinate roles of Gag and RNA helicase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA. *Journal of virology*, 85, 1847-1860.

265. Warner, J.R. and McIntosh, K.B. (2009) How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular cell*, 34, 3-11.
266. Wool, I.G. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in biochemical sciences*, 21, 164-165.
267. Ramakrishnan, V. and Moore, P.B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Current opinion in structural biology*, 11, 144-154.
268. Coetzee, T., Herschlag, D. and Belfort, M. (1994) Escherichia coli proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes Dev*, 8, 1575-1588.
269. Semrad, K., Green, R. and Schroeder, R. (2004) RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from Escherichia coli. *Rna*, 10, 1855-1860.
270. Ameres, S.L., Shcherbakov, D., Nikonova, E., Piendl, W., Schroeder, R. and Semrad, K. (2007) RNA chaperone activity of L1 ribosomal proteins: phylogenetic conservation and splicing inhibition. *Nucleic acids research*, 35, 3752-3763.
271. Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B.P., Romby, P. et al. (2013) Escherichia coli ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS biology*, 11, e1001731.
272. Mekdad, H.E., Boutant, E., Karnib, H., Biedma, M.E., Sharma, K.K., Malytska, I., Laumond, G., Roy, M., Real, E., Paillart, J.C. et al. (2016) Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling. *Retrovirology*, 13, 54.
273. Mailler, E., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.C., Vivet-Boudou, V. and Smyth, R.P. (2016) The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. *Viruses*, 8.
274. Dieci, G., Bottarelli, L., Ballabeni, A. and Ottonello, S. (2000) tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein expression and purification*, 18, 346-354.
275. McKinstry, W.J., Hijnen, M., Tanwar, H.S., Sparrow, L.G., Nagarajan, S., Pham, S.T. and Mak, J. (2014) Expression and purification of soluble recombinant full length HIV-1 Pr55 protein in Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 100C, 10-18.
276. You, C. and Piehler, J. (2014) Multivalent chelators for spatially and temporally controlled protein functionalization. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 3345-3357.
277. Boudier, C., Humbert, N., Chaminade, F., Chen, Y.Y., de Rocquigny, H., Godet, J., Mauffret, O., Fosse, P. and Mely, Y. (2014) Dynamic interactions of the HIV-1 Tat with nucleic acids are critical for Tat activity in reverse transcription. *Nucleic acids research*, 42, 1065-1078.
278. Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K.K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Duportail, G. and Mely, Y. (2011) Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. *Nucleic acids research*, 39, 6633-6645.
279. Sharma, K., Didier, P., Darlix, J.L., de Rocquigny, H., Bensikaddour, H., Lavergne, J.P., Penin, F., Lessinger, J.M. and Mely, Y. (2010) Kinetic analysis of the nucleic acid chaperone activity of the hepatitis C virus core protein. *Nucleic acids research*, 38, 3632-3642.
280. Sharma, K.K., de Rocquigny, H., Darlix, J.L., Lavergne, J.P., Penin, F., Lessinger, J.M. and Mely, Y. (2012) Analysis of the RNA chaperoning activity of the hepatitis C virus core protein on the conserved 3'X region of the viral genome. *Nucleic acids research*, 40, 2540-2553.
281. Darlix, J.L., Vincent, A., Gabus, C., de Rocquigny, H. and Roques, B. (1993) Trans-activation of the 5' to 3' viral DNA strand transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of HIV1 RNA. *C R Acad Sci III*, 316, 763-771.
282. You, J.C. and McHenry, C.S. (1993) HIV nucleocapsid protein. Expression in Escherichia coli, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 268, 16519-16527.
283. Bernacchi, S. and Mely, Y. (2001) Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic acids research*, 29, E62-62.

- 284. Rye-McCurdy, T.D., Nadaraia-Hoke, S., Gudleski-O'Regan, N., Flanagan, J.M., Parent, L.J. and Musier-Forsyth, K. (2014) Mechanistic differences between nucleic acid chaperone activities of the Gag proteins of Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 are attributed to the MA domain. *Journal of virology*, 88, 7852-7861.
- 285. Cruceanu, M., Gorelick, R.J., Musier-Forsyth, K., Rouzina, I. and Williams, M.C. (2006) Rapid kinetics of protein-nucleic acid interaction is a major component of HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function. *Journal of molecular biology*, 363, 867-877.
- 286. Austin, L., Zmistowski, B., Chang, E.S. and Williams, G.R., Jr. (2011) Is reverse shoulder arthroplasty a reasonable alternative for revision arthroplasty? *Clinical orthopaedics and related research*, 469, 2531-2537.
- 287. Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K., Semrad, K., Schroeder, R. and Tompa, P. (2009) Janus chaperones: Assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS letters*, 583, 88-92.

Hassan KARNIB

***Interaction de Gag(NC) du VIH-1
avec la protéine ribosomique RPL7:
caractérisation du complexe et rôle
dans le cycle réplcatif***

Résumé

A la fin du cycle viral, la polyprotéine Gag du VIH-1 polymérise afin de former la particule virale et recrute les partenaires viraux et cellulaires permettant le bourgeonnement de particules infectieuses. De plus, par son activité de chaperonne des acides nucléiques, elle induit la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral. Plusieurs études *in vitro* ont montré que Gag possédait une faible activité de chaperonne. Nous avons donc cherché à identifier un partenaire cellulaire qui, en étant recruté par Gag, serait capable d'en améliorer l'activité. Parmi les partenaires identifiés, nous nous sommes intéressés à la protéine ribosomale RPL7. Nous avons caractérisé le complexe Gag-RPL7 et montré que le domaine NCp7 de Gag interagissait avec les parties N et C terminales de RPL7. En se basant sur un test *in vitro* consistant à suivre l'hybridation de cTAR avec dTAR, nous avons montré que la RPL7 possédait une activité chaperonne des acides nucléiques supérieure à celle de Gag et que l'activité du complexe Gag-RPL7 était supérieur à celle de chaque protéine. Enfin, nous avons déchiffré le mécanisme d'hybridation de cTAR/dTAR et montré que la RPL7, Gag ou Gag-RPL7, formaient l'hybride cTAR/dTAR suivant différentes voies. Tous ces résultats nous ont permis de proposer un modèle dans lequel, une fois exprimée, Gag serait capable de recruter la protéine RPL7 pour améliorer son activité de chaperonne.

Abstract

During the late stage of the viral cycle, the HIV-1 Gag polyprotein polymerize to form the viral particle and recruits the viral and cellular partners allowing the budding of infectious viruses. Moreover, by its nucleic acid chaperone activity Gag induce the dimerization and the encapsidation of the viral RNA. Several *in vitro* studies have shown that Gag has a low chaperone activity. We identified a cellular partner which, by being recruited by Gag, would be able to improve its chaperone activity. Among the identified partners, we were interested in the ribosomal protein RPL7. We characterized Gag-RPL7 complex and based on an *in vitro* test that follow the annealing of cTAR with dTAR, we showed that RPL7 has better nucleic acid chaperone activity than Gag and that the activity of the Gag-RPL7 complex was higher than each protein alone. Additionally, we characterized the annealing mechanism of cTAR / dTAR and showed that RPL7, Gag or Gag-RPL7 formed the cTAR / dTAR extended duplex in different ways. All these results allowed us to propose a model in which, once expressed, Gag would be able to recruit the RPL7 to boost its chaperone activity.