



Etude du relargage du VIH-1 en temps réel à l'échelle de la cellule unique par la Viro-fluidique

Joelle Eid

► To cite this version:

Joelle Eid. Etude du relargage du VIH-1 en temps réel à l'échelle de la cellule unique par la Viro-fluidique. Virologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT007 . tel-04557054

HAL Id: tel-04557054

<https://theses.hal.science/tel-04557054>

Submitted on 24 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

Ecole Doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé – CBS2

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier - IRIM

Etude du relargage du VIH-1 en temps réel à l'échelle de la cellule unique par la Viro-fluidique

Présentée par Joelle EID

Le 19 Avril 2022

Sous la direction de Marylène MOUGEL
et Marius SOCOL

Devant le jury composé de

Monsieur Pierre JOSEPH, Chargé de Recherche HDR CNRS, Université de Toulouse

Madame Isabelle IMBERT, Professeur CNRS, Université Aix Marseille

Monsieur Joël CHOPINEAU, Professeur CNRS, Université de Montpellier

Madame Marylène MOUGEL, Directrice de recherche CNRS, Université de Montpellier

Monsieur Marius SOCOL, Ingénieur de Recherche CNRS, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Président

Directrice

Co-encadrant



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

À mon Père...
Il saura pourquoi...

Remerciements

Cette thèse de doctorat est le fruit d'un travail long et laborieux de trois ans et demi au sein de l'Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM). Ce travail et cette expérience n'auraient pas été possibles sans l'accompagnement et le soutien d'un grand nombre de personnes. Ce travail a été possible grâce au financement de la fondation de l'Infectiopôle Sud à Marseille durant ces trois années et demi.

Tout d'abord je souhaiterais remercier les membres de mon jury de thèse, Dr. **Isabelle Imbert**, Dr. **Pierre Joseph** et Dr. **Joël Chopineau** pour l'évaluation qu'ils ont voulu apporter à mes travaux par la lecture de ma thèse. J'aimerais remercier Dr. Isabelle Imbert et Dr. Joël Chopineau pour leurs expertises et leurs commentaires pertinents dont j'ai pu bénéficier durant mes comités de thèse.

Un énorme merci pour mes deux directeurs de thèse, Dr. **Marylène Mougel** et Dr. **Marius Socol**. Marylène, je te remercie pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse au sein de ton équipe. J'espère avoir été à la hauteur de tes espérances et que le travail que nous avons effectué t'as convenu. Un grand merci pour ton encadrement et ton expertise, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour tes conseils, ton expérience et l'aide que tu m'as apportée (you know what I mean). Je ne vais jamais oublier tes « Deal... », je te souhaite beaucoup de belles choses dans l'avenir et surtout un grand progrès dans la viro-fluidique. **Marius**, un grand merci pour ton expertise et tes encouragements sans failles tant au niveau scientifique qu'au niveau personnel. Tu étais là du premier moment jusqu'à la fin. Nos discussions étaient toujours intéressantes et fructueuses (malgré le tas des formules physiques qui m'ont accompagnées durant ces quatre années ☺). Je te souhaite un avenir plein de succès. It is very challenging de mener un projet multidisciplinaire et de trouver un compromis entre les différentes disciplines mais j'ai pu profiter de l'expérience et des conseils de chacun d'entre vous. I owe you a lot !

Jérôme, je te remercie pour ton soutien et tes encouragements durant ces années. Un grand merci pour les gâteaux que tu as fait pour mes anniversaires. Dommage cette année je n'aurai pas la chance de fêter avec toi mes 28 ans... et de goûter un de tes chef d'œuvre (Dark chocolate with red fruits). Mais tu sais quoi... nobody

knows... on le fera un jour sans doute (you now that I cannot miss a chocolate cake). Je n'oublierai jamais nos conversations de tout et de rien surtout sur le sujet « Argent et Bonheur » auquel on n'a jamais abouti à une conclusion. Je te souhaite plein de bonheur aussi bien professionnellement que personnellement. N'oublie pas « Rire quand on a envie de pleurer » ☺☺☺...

Sébastien, j'avais le plaisir de te rencontrer. Malgré que tu chronométrais mes présentations (10min avec discussion), je voyais ton intérêt vis-à-vis de mon travail même avec nos thématiques différentes. Je te remercie pour tes observations et commentaires. Un grand merci pour la belle journée que nous avons passé chez toi. Je ne l'oublierai jamais.

Felipe, fue un placer conocerle durante mi tesis. I do not know if we say it like this (it is deep and). I enjoyed all the conversations we had especially those about your French classes (I saw how much you suffered☹). I wish you all the happiness and success in the future.

Un grand merci à tous les membres de la plateforme CTM pour votre bonne humeur et votre accueil chaleureux, c'était ma deuxième maison. Merci **Benoit, Fred et Jean-Marie**. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre sourire quotidien qui m'ont facilité le travail. J'ai partagé avec vous beaucoup de jolis moments que je n'oublierai jamais. Je n'oublierai jamais nos sorties, nos raclettes et nos lotos de Noël ☺.

J'aimerais remercier **Joël Chopineau, Marie Morille et Christophe Dorandeu** pour votre accueil, votre gentillesse et vos disponibilités lors de mes expériences de NTA. C'était un grand plaisir d'avoir fait votre connaissance. Les jours où j'avais des manips en Faculté de Pharmacie étaient infernaux vu la distance que je devais parcourir jusqu'à la plateforme mais dernièrement avec le beau bâtiment qu'ils vous ont construit à côté de chez nous, j'ai bien aimé faire plus de manips.

Un grand merci pour tous les membres de la plateforme de microscopie de MRI. **Leslie et Orestis**, j'avoue que je ne vous ai pas mal embêté durant ces trois années avec mes soucis en microscopie. Vous m'avez formé au Nikon et vous étiez toujours disponibles pour résoudre n'importe quel problème. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Merci pour les doctorants et les post-doctorants de l'institut. **Sandrine** et **Lise**, je vous remercie pour vos conseils et votre présence à mes côtés durant cette dernière période. J'ai toujours voulu apprendre de votre expérience. Une petite pensée pour les stagiaires qui sont passés par le labo au cours de ces dernières années : **Camille**, **Thomas D.**, **Saskia** et **Adam**. Bon courage pour la suite de vos parcours. Merci **Thomas G.**, ce fût un plaisir de t'encadrer lors de ton stage de L3 tu es un stagiaire comme on aimerait en avoir tout le temps ! Bon courage pour la suite. Je te souhaite tout le succès ☺.

Merci à tous mes amis, sans votre présence et votre soutien, cette thèse aurait été plus compliquée. Je ne sais pas si l'on croit au coup de foudre amical ; quand on rencontre une personne avec qui ça fonctionne tout de suite tellement qu'on sait qu'elle est notre âme sœur amicale. Je l'ai vécu, cette rencontre. **Nadine**, my twin, déjà 7 ans qu'on évolue côte à côte chacune dans sa vie avec toutes nos péripéties. Tu as été un vrai pilier pendant toutes ces années, dans les bons comme dans les mauvais moments. There are no words to describe how much you mean to me. Merci de remarquer quand je ne vais pas bien et de m'offrir le support dont j'ai besoin quand ça ne va pas. Je te remercie pour ton écoute, tes conseils et surtout des appels même avec le décalage d'horaire entre la France et la Canada. Je n'ai jamais été aussi heureuse qu'une personne, comme toi, sera à mes côtés. **Christelle**, un grand merci pour ton support et tes conseils durant cette période. J'ai voulu toujours apprendre de ton expérience. **Audrey** et **Ora**, mes amies de la salle blanche. Je vous remercie d'être présentes dans ma vie. Je ne vais jamais oublier les beaux moments que nous avons passés ensemble ni les conversations que nous avons eues de tout et de rien. Je vous souhaite tout le bonheur et le succès dans la vie. Nous resterons sûrement en contact même après mon départ. Vous êtes des amies de qualité.

Il y a les amis. Il y a la famille. Et il y a les amis qui deviennent une famille. Mon trio: **Charbel** "*The Legend*", **Emile** "*The Limited Edition since 1993*" et **Zeinab** "*My partner in crime*" (you know what I mean). Tellement de choses à raconter mais je ne sais pas d'où commencer. Sorties, soirées (...), anniversaires (foutues à cause de l'ascenseur...), randonnée, larmes, rires, combats... Nous avons partagé beaucoup de moments inoubliables. Mais avant tout vous étiez un grand support pour moi. Votre présence m'a beaucoup facilité cette période. **Zeinab**, mon chef, tu as été toujours

prête à entendre mes problèmes et à me supporter. Je ne vais jamais oublier tes soupirs quand je disais des bêtises. J'ai beaucoup apprécié les conseils que tu m'as donné durant cette période et surtout les conseils médicaux que tu me donnais en me considérant une de tes souris. Peu importe où je serai après, vous resterez mon trio et je resterai votre amie « miniaturisée ». Je vous souhaite tout le succès que vous méritez. Cheers to many more years of friendship (with wine...)

Les Sweidy, ma deuxième famille **Bernard**, **Nana** et **Sakr**. Peu importe de combien de temps nous faisons connaissance des personnes, ce qui importe c'est le type de relation qui nous unit. Nana, j'ai vu en toi la tendresse d'une maman et le support d'une enseignante. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton sourire quotidien et ton soutien que j'apprécie énormément en cette période difficile. Sakr, j'ai vu en toi l'amour et la peur que n'importe quel père ait envers sa fille. Bernard, je n'arrive pas à exprimer à quel point je suis reconnaissante d'avoir fait ta connaissance depuis 10 ans. Tu ne m'as laissé jamais sentir la distance qui nous sépare. Tu étais toujours la source de ma joie, ma motivation et mon espoir. En ce temps très court, nous avons partagé les sourires, les larmes, le support et dernièrement même la grippe. Maintenant je crois à la communication télépathique entre les âmes. Bero, je te remercie pour ta présence, tes encouragements sans failles et tes conseils avisés dans mes moments de doute. Ma grâce de Dieu, le cadeau le plus précieux qu'une personne souhaite avoir.

Pour terminer, un grand merci à ma famille. Sans votre présence rien n'aurait été possible. Une pensée particulière à mes tantes **Marie** et **Eva**. Je vous remercie pour votre support et votre encouragement durant nos appels (à ne pas oublier le stock des gâteaux libanais à chaque retour des vacances). Mon oncle, **Michel**, tu étais mon support dès ma naissance jusqu'à ce jour. Je me souviens de ta présence et de ton soutien pendant les premiers jours à Lyon. J'avais toujours le plaisir, comme tous les membres de notre famille, de t'entendre parler le français impeccable ! Un énorme merci à mes **parents**. Vous êtes les meilleurs parents que j'aurai pu imaginer. Je vous remercie pour vos encouragements et votre soutien non seulement durant mon doctorat mais aussi dans toutes les épreuves que j'ai traversées. Malgré que vous ne compreniez pas toujours ce que je vous racontais, vous avez toujours su trouver les mots pour me motiver. Dès le début de mes études vous avez cru en moi et vous m'avez soutenu dans tous mes choix. J'espère que vous êtes fier de moi. Papa, je

sais à quel point cette thèse compte pour toi, je sais que tu as sacrifié ta vie pour que nous aurons, ma sœur et moi, les diplômes que nous souhaitons avoir. Maman, mon ange, tu étais toujours présente à mes côtés et prête quand j'avais besoin de n'importe quel aide. Tu nous as tout offert pour arriver là où nous sommes actuellement. Tu es une maman en or. Enfin, merci à ma sœur, **Marie-Ange**. My N°1 support system. Tu étais toujours présente et prête à m'entendre malgré tes préoccupations. Nous avons passé pas mal de temps ensemble durant ton séjour à Toulouse, par contre avec ton déménagement à Nantes je vois vraiment la différence. Tu m'as manqué énormément mimzo. Tu seras la prochaine dans la famille à soutenir ta thèse. Je te souhaite tout le succès que tu mérites (avec les blocs de béton que tu manipules et par lesquels je n'étais jamais intéressée... désolée ☹).

Liste des Abréviations

aa	Acide aminé
ABCE1	<i>ATP Binding Cassette subfamily E member 1</i>
ALIX	<i>ALG-2 Interacting Protein X</i>
AP	<i>Adaptor Protein</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA Editing catalytic polypeptide-like</i>
ARNg	ARN génomique
ASP	<i>Antisens Protein</i>
dNTP	Désoxyribonucléoside Triphosphate
CA	Capside
CCR5	<i>C-C Chemokine Receptor type 5</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CRF	<i>Circulative Recombinant Form</i>
CRM1	<i>Chromosomal Maintenance 1</i>
CTD	<i>C-terminal domain</i>
Dbp5	<i>Dead-box protein 5</i>
DIS	<i>Dimer Initiation Site</i>
eIF4	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor</i>
Env	Enveloppe
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
EV	<i>Extracellular Vesicles</i>
Gag	<i>Group-specific Antigen</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gp	Glycoprotéine
HBR	<i>High Basic Domain</i>
IN	Intégrase
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
KDa	KiloDalton
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
MA	Matrice
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
m ⁷ G	mRNA 7-methylguanosine
MP	Membrane Plasmique
MVB	<i>MultiVesicular Bodies</i>
Naf1	<i>Nef Associated Factor 1</i>
NC	Nucléocapside
Nef	<i>Negative Factor</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-light chain enhancer of activated B cells</i>

NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
NTD	<i>N-terminal domain</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
PIC	<i>Pre-Integration Complex</i>
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate
Pol	Polymérase
PolyA	Site de Polyadénylation
PPT	<i>Polypurine tract</i>
PR	Protéase
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor</i>
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
Rev	<i>Regulator of viral expression</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i>
RRE	<i>Rev Response Element</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RTC	<i>Reverse Transcription Complex</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
SD	Site Donneur
SEM	Scanning Electron Microscopy
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SRFM	<i>Super Resolution Fluorescence Microscopy</i>
Tat	<i>Transactivateur de la transcription</i>
TAR	<i>Trans-activating response element</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TF	<i>Transcription Factor</i>
Vif	<i>Viral Infectivity Factor</i>
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine - 1
VLP	<i>Viral Like Particle</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral Protein U</i>
ZF	<i>Zinc Finger</i>

Liste des figures

Figure 1: Distribution mondiale des sous-types du VIH-1 et des formes recombinantes	17
Figure 2: Représentation graphique de la progression de l'infection par le VIH-1	19
Figure 3: Représentation schématique d'une particule virale mature du VIH-1.	21
Figure 4: Structure du provirus VIH-1	23
Figure 5: Structure de la protéine Gag du VIH-1	24
Figure 6: Structure tridimensionnelle d'un trimère du domaine MA du VIH-1 et son interaction avec les groupes PI(4,5)P2	26
Figure 7: Structure tridimensionnelle du domaine CA et architecture de la capside mature du VIH-1.	27
Figure 8: Illustration du réarrangement conformationnel du domaine SP1 lors de l'assemblage du VIH-1.	28
Figure 9: Structure tridimensionnelle du domaine NC du VIH-1.	29
Figure 10: Structure tridimensionnelle du domaine p6 du VIH-1 et son interaction avec les composants du système cellulaire ESCRT.	31
Figure 11: Schéma du cycle réplcatif du VIH-1	35
Figure 12: Entrée du VIH-1 dans la cellule hôte	37
Figure 13: Etapes de la transcription inverse de VIH-1	40
Figure 14: Intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire	41
Figure 15: Etapes de l'épissage des différents transcrits du VIH-1	43
Figure 16: Export nucléaire des différents ARN du VIH-1	45
Figure 17: Représentation simplifiée des étapes de l'assemblage du VIH-1.	47
Figure 18: Interactions des domaines NC et p6 de Gag avec Alix et Tsg101.	53
Figure 19: Etapes du clivage de la polyprotéine Pr55^{Gag}	55
Figure 20: Illustration des puces à base de PDMS	57
Figure 21: Illustration des deux types d'écoulement d'un fluide	62
Figure 22 : Illustration du profil de distribution de la vitesse du flux dans un canal rectangulaire quand $H \ll L$ et W	68
Figure 23: Modélisation mathématique de la variation du taux de production virale en fonction de la mortalité cellulaire.	74
Figure 24: Représentation schématique de l'établissement des lignées cellulaires productrices des VLP-GFP	78
Figure 25: Représentation schématique de la préparation du stock viral à partir de population de cellules	79
Figure 26: Montage expérimental des expériences du NTA	81
Figure 27: Les dessins Clewin des différentes générations de puces	82
Figure 28: La microfabrication des puces par la technique standard de photolithographie	83
Figure 29: Le montage expérimental des expériences de vidéomicroscopie à la plateforme MRI	85
Figure 30: Représentation des trois formes du piège dans la puce de capture.	88
Figure 31: Fonctionnement de la puce de capture.	89
Figure 32: Cellule piégée (piège en V) dans la puce de capture.	90

Figure 33: Représentation de la répartition du flux dans un microcanal rectangulaire ayant un rapport d'aspect arbitraire h/w	91
Figure 34: Représentation schématique des vitesses et des pressions dans la puce de capture ($h = 22\mu m$)	92
Figure 35: Graphe montrant les variations des vitesses moyennes dans les différentes sections de la puce de capture en fonction de la pression P_1	93
Figure 36: Etude des contraintes de cisaillement subies par une cellule piégée en puce de capture	95
Figure 37: Représentation de la puce de détection	97
Figure 38: Estimation de la concentration des VLP-GFP en fonction de la vitesse moyenne du flux	100
Figure 39: Taux de production virale à partir de population de cellules HeLa monoclonales et HEK 293 polyclonales.	103
Figure 40: Représentation schématique de la puce couplée 1ère génération	104
Figure 41: Cellule HeLa produisant des VLP-GFP piégée dans la puce couplée.	105
Figure 42: Représentation schématique des vitesses et des pressions dans les différentes sections de la puce couplée	106
Figure 43: Observation d'une VLP-GFP traversant le canal de détection	107
Figure 44: Cinétique en temps réel de la production virale d'une cellule HeLa unique	108
Figure 45: Représentation schématique de la puce couplée multiplexe	109
Figure 46: Illustration du système Zero-Mode Waveguide (ZMW)	139

Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des différentes techniques de quantification de virus à partir de surnageants de cellules en culture	71
Tableau 2: Quantification par virométrie en flux de la production virale à partir de population de deux types cellulaires	99
Tableau 3: Quantification d'une production virale de 5h à partir d'une population de cellules HeLa monoclonale par les deux techniques NTA et virométrie en flux (puce de 6,7µm).....	101
Tableau 4: Quantification par la technique NTA de la production virale de 5h à partir de population de cellules HEK 293 polyclonale	102
Tableau 5: Comparaison entre notre virométrie en puce de détection et la technique NTA.....	114
Tableau 6: Comparaison entre notre virométrie avec la puce de détection et la technique des nanopores.	140

Table des matières

Introduction	15
Partie 1: Le virus de l'Immunodéficience Humaine	16
1. Généralités sur le VIH	16
1.1. Classification et diversité génétique	16
1.2. Transmission et physiopathologie du VIH-1	18
1.3. Situation épidémiologique actuelle	20
2. Composition du VIH-1	20
2.1. Structure de la particule virale	20
2.2. Organisation du génome viral	22
2.3. Les protéines virales	24
2.4. Cycle réplcatif du VIH-1	35
Partie 2 : La Microfluidique	56
1. Introduction à la Microfluidique continue	56
1.1. Définition	56
1.2. L'application de la Microfluidique continue pour l'étude du VIH-1	58
2. Lois physiques de la Microfluidique	59
2.1. Fluide Newtonien	59
2.2. Écoulements des fluides à l'échelle micro- et nanométrique	60
Partie 3 : Quantification de la production virale	69
Objectifs	72
Matériels et Méthodes	76
1. Etablissements des lignées stables productrices des VLP-GFP	77
2. Préparation du stock viral à partir de populations de cellules	78
3. NTA	79
4. Fabrication des puces microfluidiques	81
5. Opération des puces	84
6. Microscopie	86
Résultats	87
1. Capture de cellules uniques et étude des contraintes de cisaillement	88
2. Etude de la production virale à partir de populations de cellules	96
2.1. Virométrie en flux	96
2.2. Comparaison de la virométrie de flux avec le NTA	101

3. Etude de la dynamique de relargage de VLPs en temps réel à l'échelle de la cellule unique	104
3.1. Puce couplée première génération	104
3.2. Puce couplée multiplexe deuxième génération	109
Discussion et Perspectives	110
Bibliographie	121
Annexe	137

Introduction

Partie 1: Le virus de l'Immunodéficience Humaine

1. Généralités sur le VIH

1.1. Classification et diversité génétique

Il existe quatre grands groupes de VIH-1 qui diffèrent par leur variabilité génétique, leur distribution géographique, ainsi que par l'aggravation de l'épidémie causée (Hemelaar, 2012). Le groupe M a été le premier découvert en 1983 et est responsable de 99,6% des infections de part le monde (Barre-Sinoussi et al., 1983). Il existe neuf sous-types A-D, F-H, J et K avec les deux sous-types B et C qui sont considérés majoritaires et qui se retrouvent en Europe et en Amérique du Nord pour le sous-type B, et en Afrique Centrale, du sud, et Sub-Saharienne et en Asie pour le sous-type C (Hemelaar, 2012) (**Figure 1**). A l'inverse du groupe M, les groupes N et O sont moins fréquentés chez les humains (Kandathil et al., 2005). Le groupe O, découvert en 1990, est responsable des endémies en Afrique du centre et de l'Ouest et présente les sous-types I-V (De Leys et al., 1990). Huit ans plus tard, en 1998, le groupe N a été identifié chez une femme de Cameroun à l'Ouest de l'Afrique (Simon et al., 1998). Le groupe P fut le dernier identifié, en 2009, chez deux patients originaires du Cameroun (Plantier et al., 2009).

La pandémie du VIH est caractérisée par la persistance face au système immunitaire, la résistance aux thérapies ainsi que l'absence d'un vaccin efficace. Ceci est la résultante d'une diversité génétique qui, elle-même, résulte de deux facteurs principaux : les mutations fréquentes dans le génome viral et la recombinaison virale. Le premier facteur est dû à la transcriptase inverse qui ne possède pas de relecture et de correction lors de la transcription inverse. Il a été montré que le taux d'erreurs, par cycle viral, est de l'ordre de $1,4 \times 10^{-5}$ erreurs / paire de base (Abram et al., 2010) mais ce taux peut atteindre, *in vivo*, 4×10^{-3} mutations / base / cellule (Cuevas et al., 2015). Le second facteur, basé sur la recombinaison, a lieu lors de la co-infection d'une cellule par au moins deux virus. Pendant la transcription inverse des différents génomes viraux comportant des séquences de ses différents ancêtres, l'enzyme peut alors sauter d'un génome à l'autre pour produire et former de nouveaux virus. Des études *in vitro* ont montré 3 à 9 recombinaisons / génome / cycle de réplication (Chen

et al., 2006; Chen et al., 2005; Jetzt et al., 2000). La co-infection d'un patient par différents sous-types viraux induit des recombinaisons entre les génomes viraux. Si les formes recombinantes qui résultent se retrouvent chez plus de trois patients non liés épidémiologiquement, elles s'appellent formes recombinantes circulantes (CRF (Hemelaar et al., 2011)). Dans le cas où ces CRFs ne correspondent pas aux critères elles seront définies comme formes uniques recombinantes (URFs).

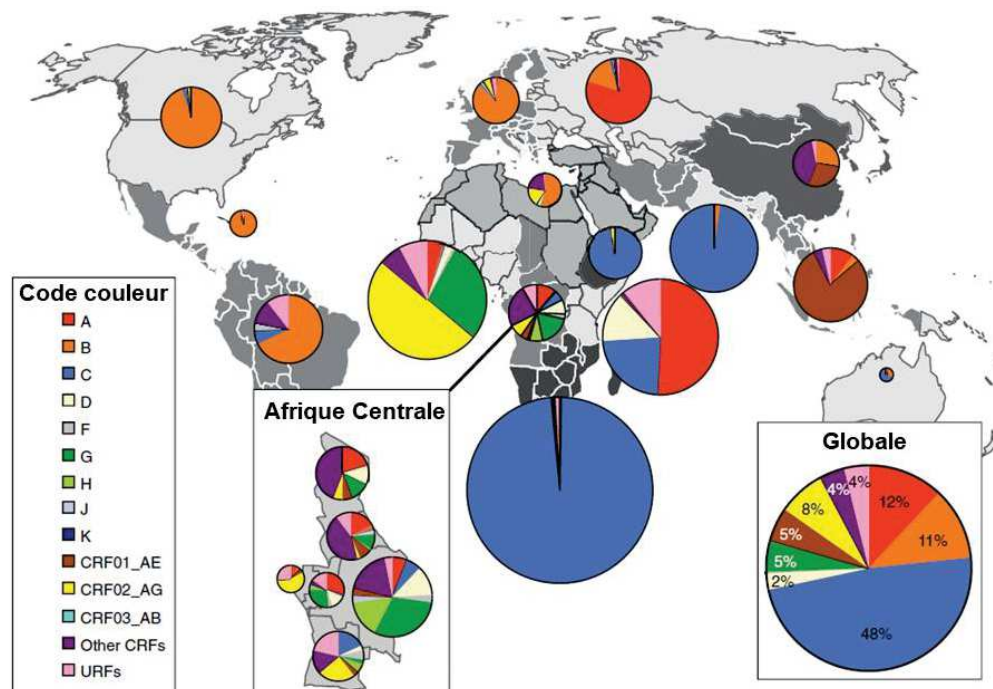


Figure 1: Distribution mondiale des sous-types du VIH-1 et des formes recombinantes

La distribution des différents sous-types et des formes recombinantes majeures du groupe M du VIH-1 sont représentés par le code couleur décrit à gauche. Les diagrammes représentent le nombre des personnes infectées par les différents sous-types dans le monde entier (à droite) et en Afrique Centrale (au milieu) (D'après (Hemelaar, 2012)).

1.2. Transmission et physiopathologie du VIH-1

Le VIH se transmet majoritairement par la voie sexuelle lors des rapports non protégés par le sperme et les sécrétions vaginales mais il peut se transmettre par l'échange des liquides corporels provenant des personnes infectées comme le sang et le lait maternel ou bien encore de la mère à son enfant pendant la grossesse et lors de l'accouchement (Shaw and Hunter, 2012; Volmink and Marais, 2007).

Le virus doit surmonter l'épithélium qui présente la première barrière de défense contre les agents pathogènes. Malgré les facteurs sécrétés par les cellules épithéliales pour prévenir toute infection, le VIH réussit à atteindre et infecter ses cellules cibles telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les macrophages. Les cellules de Langerhans qui se présentent dans la muqueuse amènent le virus vers le compartiment subépithélial pour atteindre les tissus lymphoïdes et infecter les lymphocytes T CD4⁺ exprimant à leur surface le corécepteur CCR5. Le virus se dissémine et induit une déplétion massive des LT CD4⁺ (Moir et al., 2011; Morrow et al., 2007).

L'infection par le VIH se caractérise par trois phases (**Figure 2**) : la phase aiguë, la phase chronique et le SIDA qui représente la phase finale de l'infection et qui se caractérise par un affaiblissement dramatique du système immunitaire.

La phase aiguë se caractérise par des symptômes qui ressemblent à un syndrome pseudo-grippal et qui varient selon les patients. Elle dure entre trois semaines et trois mois. Pendant les six premiers jours suivant l'infection, le virus n'est pas détectable et colonise les cellules de la muqueuse du site de transmission ainsi que les sous-muqueuses associées. Ensuite, la dissémination du virus dans le sang périphérique et les tissus lymphoïdes secondaires est accompagnée d'une réplication virale accentuée, d'une diminution massive du taux des lymphocytes T CD4⁺ et d'un établissement des réservoirs viraux persistants. Ces événements déclenchent les réponses immunitaires humorale et cellulaire qui s'expriment par la production des anticorps anti-VIH et de LT CD8⁺. Ceux-ci provoquent la réduction de la virémie et une augmentation des LT CD4⁺, deux indices marquant la fin de la phase aiguë (Cohen et al., 2011; Li et al., 2005). A ce stade, le diagnostic se réalise par la détection de l'ARN viral par RT-qPCR, des anticorps et/ou de l'antigène p24 par ELISA.

La stabilisation de la réplication virale marque la deuxième phase de l'infection, la phase chronique, dont la durée varie de moins de trois ans jusqu'à plus de dix ans. Cette phase asymptomatique se caractérise par une charge virale stable et un établissement des réservoirs viraux dans les LT qui présentent le virus latent intégré dans le génome cellulaire. La chronicité de cette phase est causée par la diminution progressive du taux des LT CD4+ au cours des années (Lambotte et al., 2005). Lorsque ce taux chute en dessous de 200 LT CD4+/mm³, le patient perd complètement son immunité cellulaire et sera par la suite davantage susceptible à des pathogènes opportunistes (bactéries, virus et parasites). On dit qu'il est immunodéprimé et débute le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), la dernière phase de l'infection par le VIH (Grossman et al., 2006). Sans prise en charge thérapeutique, celui-ci est mortel.

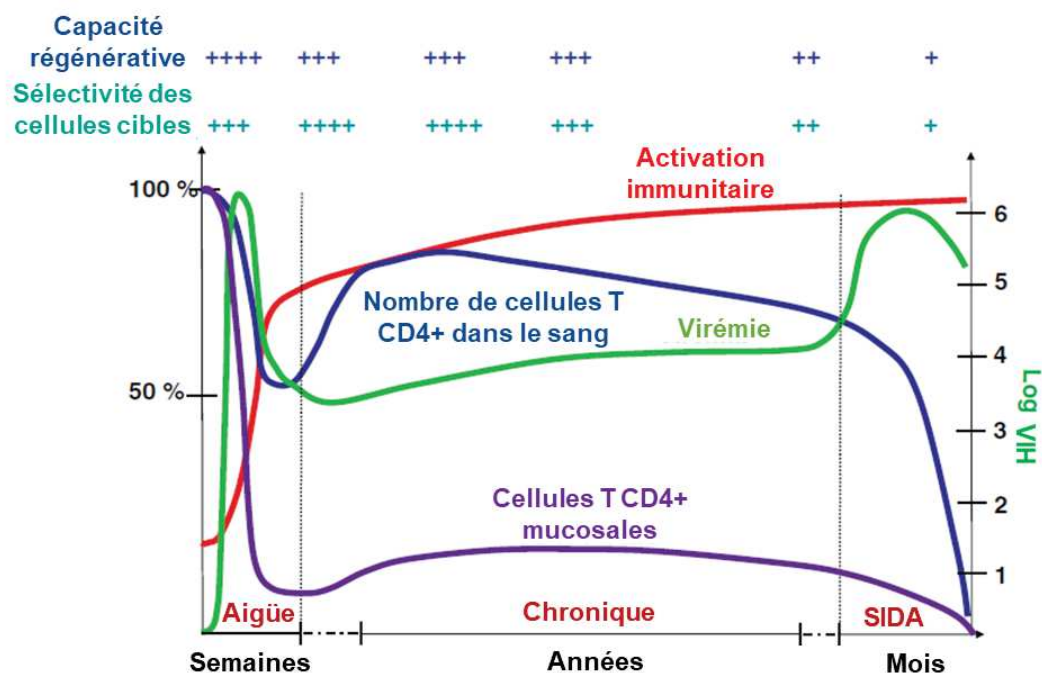


Figure 2: Représentation graphique de la progression de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 se caractérise par trois phases: la phase aigüe, la phase chronique et le SIDA. Le graphe montre le changement du nombre des cellules T CD4+ muqueuses et sanguines et la variation de la virémie durant les trois phases en relation avec l'évolution de l'activité immunitaire ainsi que la capacité régénérative et la sélectivité des cellules cibles (D'après (Grossman et al., 2006)).

1.3. Situation épidémiologique actuelle

Le dernier rapport effectué par l'OMS en juillet 2021 révèle une estimation de 38 millions de personnes infectées par le VIH à la fin de 2020 dont 26 millions sont concentrés dans la Région africaine. Au cours de l'année 2020, 1.5 millions de personnes ont été infectées par le virus et 680 000 personnes sont mortes à cause du VIH. Nombreux sont les facteurs qui provoquent l'aggravation des infections par le VIH et selon l'OMS, la majeure partie des infections dans le monde entier touchent les personnes exposées à la prostitution et les usagers des drogues injectables.

La pandémie de COVID-19 a provoqué l'interruption des services de lutte contre le virus ainsi le ralentissement de l'action de santé publique. Face à ce scénario, l'OMS co-parraine le Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) qui a défini un plan d'action nommé 95-95-95 d'ici l'année 2030. Au sein de ce programme, l'OMS dirige les activités relatives au dépistage et aux traitements contre le VIH et la co-infection VIH-tuberculose. Ce plan vise à ce que 95% des personnes séropositives pour le VIH-1 sont dépistées, 95% de ces derniers seront sous traitement antirétroviral dont 95% auront une charge virale non détectable. Ce programme a été lancé après la réussite du plan 90-90-90 qui a été fixé pour l'année 2020. Celui-ci avait comme objectif d'atteindre moins de 500 000 nouvelles infections par an dans le monde entier. Il a été atteint par plusieurs pays tels que le Danemark, l'Islande, l'Europe centrale et de l'Ouest, l'Amérique Latine, l'Afrique Australe et de l'Est.

2. Composition du VIH-1

2.1. Structure de la particule virale

Le VIH-1 est un rétrovirus appartenant à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille *Orthoretroviridae* et au genre *Lentivirus*. C'est un virus enveloppé ayant un diamètre moyen de 140 nm. La particule virale est constituée de deux brin d'ARN génomiques (ARNg) de 10 kb de longueur, de polarité positive et qui sont encapsidés

dans la capside (CA). L'ARNg est complexé avec la nucléocapside (NC) qui est constituée des deux domaines p7 et p9. On retrouve également dans la capside, les protéines accessoires Vpr, Vif et Nef, ainsi que les deux enzymes: la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Ce complexe avec la protéase virale (PR) est entouré par la protéine p17 de la matrice (MA) qui est composée de 2000 à 5000 monomères. (Sun et al., 2019). La capside est entourée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire qui comprend huit à dix trimères de glycoprotéines d'enveloppe virale gp 120 et gp 41 (Turner and Summers, 1999; Zhu et al., 2003). Lors de la maturation du virion, la capside prend une forme conique caractéristique et est chaperonné par la protéine p6 (Figure 3).

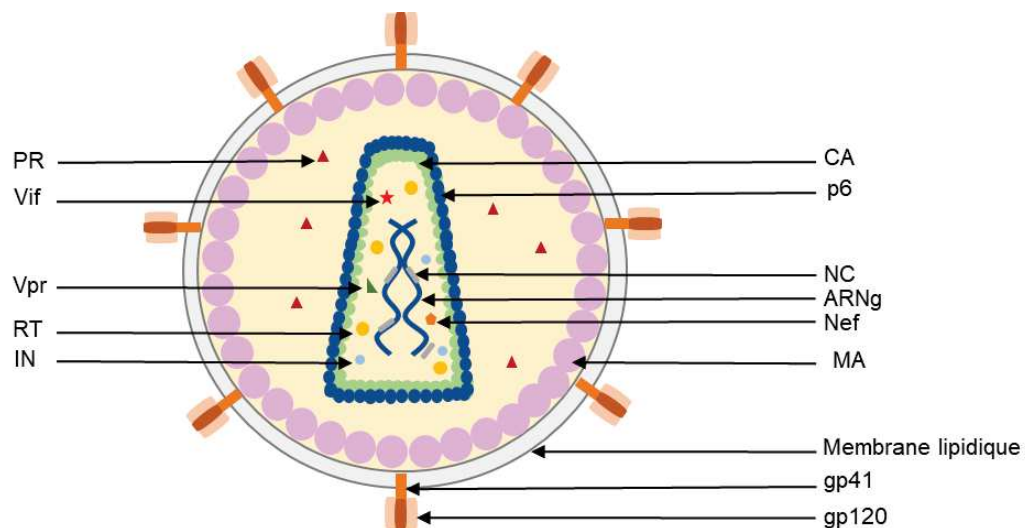


Figure 3: Représentation schématique d'une particule virale mature du VIH-1.

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies d'ARN génomique (ARNg) liées de façon non-covalente et entourées par la nucléocapside (NCp7). Le génome est protégé par la capside (CA) qui se trouve sous forme conique. Elle est couronnée par la protéine p6 qui se positionne entre CA et la matrice (MA), elle-même entourée par la membrane lipidique d'origine cellulaire au niveau de laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe (gp41 et gp120). Le virus contient également les protéines virales (RT, IN et PR) ainsi que les protéines auxiliaires (Nef, Vif et Vpr).

2.2. Organisation du génome viral

Le génome viral (ARNg) est constitué de deux brins d'ARN liés d'une façon non-covalente. Il est rétrotranscrit en ADN et intégré dans le génome de la cellule hôte. L'ADN viral est constitué de neuf cadres de lecture ouverts (ORF, pour Open Reading Frames) qui codent pour les polyprotéines Gag, Gag-Pol et Env ainsi que pour les protéines auxiliaires Nef, Vif, Vpr et Vpu, et les protéines régulatrices Tat et Rev. Ces gènes se situent entre deux séquences terminales non codantes (LTR, pour Long terminal repeats) (**Figure 4**). La séquence 5'UTR de l'ARNg est constituée de la région R, de la région U5 unique à l'extrémité 5' et de la séquence nommée « leader ». La région R comporte l'élément de transactivation de la transcription (TAR) et le signal de polyadénylation (Poly-A). La séquence « leader » est constituée du site de fixation de l'amorce de la rétrotranscription (PBS) et du site d'initiation de la dimérisation (DIS) qui forme une structure en boucle de tige avec une séquence palindromique. En plus, elle comporte le site donneur d'épissage (SD) et le signal d'encapsidation (Psi). Pour la région 3'UTR, celle-ci est divisée en région U3 qui est unique à l'extrémité 3' du génome viral, et la région R qui ressemble à celle de 5'-LTR et qui comporte les séquences TAR et Poly-A. Cette dernière est raccourcie due à la polyadénylation (Damgaard et al., 2004; Ooms et al., 2007; Sukosd et al., 2015).

L'existence d'un gène antisens a été identifié en 1988 par Roger Miller. Il se positionne dans le brin antisens de la région du gène *env* et il est capable de coder pour la protéine ASP (Landry et al., 2007; Miller, 1988).

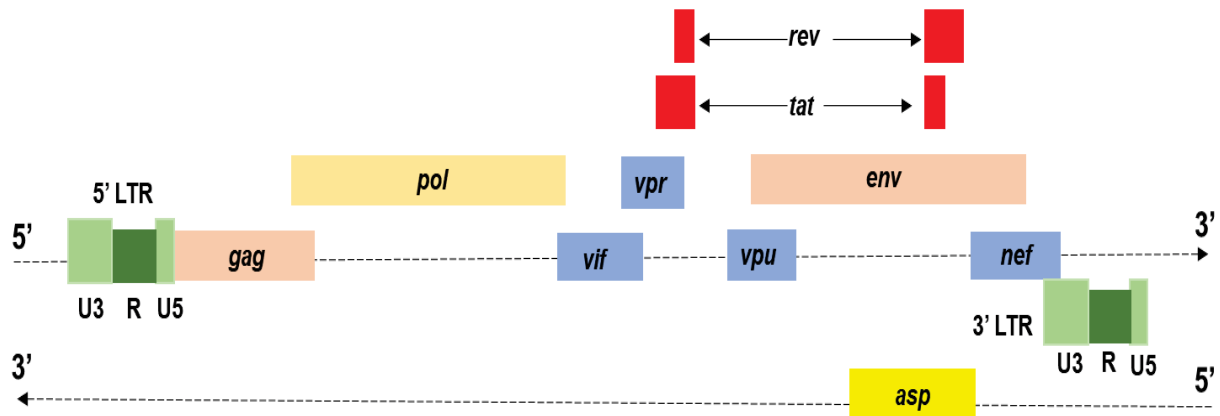


Figure 4: Structure du provirus VIH-1

Le provirus VIH-1 intégré dans le génome cellulaire est encadré par les deux séquences LTR constituées chacune des trois séquences U3, R et U5 (en vert). Il contient les trois gènes principaux *gag*, *pol*, et *env* ainsi que les deux gènes de régulation *tat* et *rev* (en rouge) et les gènes auxiliaires *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* (en bleu). Dans le brin antisens du gène *env*, il existe le gène antisens *asp* (en jaune).

2.3. Les protéines virales

a. Les protéines structurales

○ La polyprotéine Gag

Le gène *gag* code pour la polyprotéine Gag ou Pr55^{Gag} ayant un poids moléculaire de 55 KDa. Durant la maturation du virion, cette polyprotéine est clivée par la protéase virale en différentes protéines fonctionnelles : la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), la protéine p6 et les deux peptides Sp1 et Sp2 (**Figure 5**). Gag seule est suffisante pour former et relarguer des particules virales non-infectieuses nommées VLPs (Virus Like Particles). Elle a la capacité de s'auto-assembler avec le même mécanisme que celui observé avec le virus infectieux. La structure de chaque domaine de la protéine Gag est détaillée dans la partie ci-dessous.

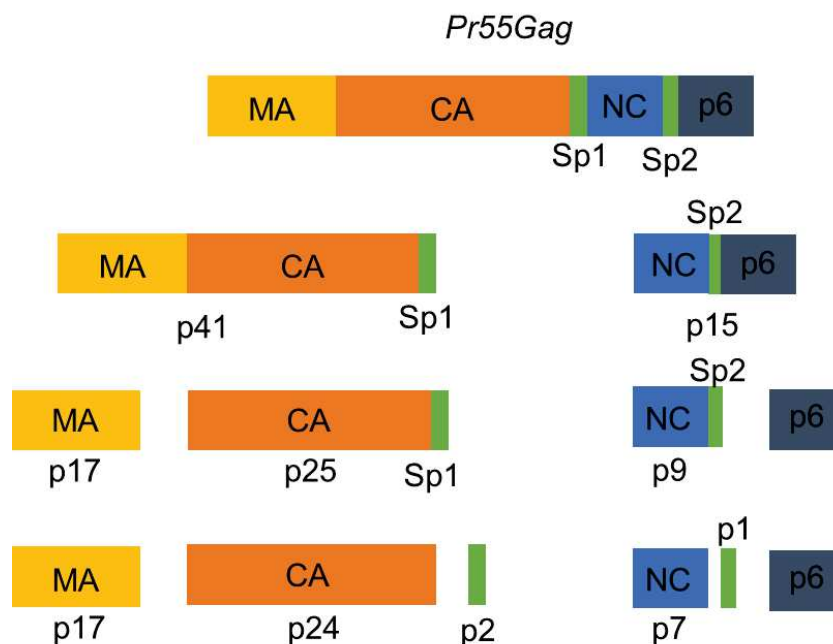


Figure 5: Structure de la protéine Gag du VIH-1

La polyprotéine P55Gag est constituée des différents domaines matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), p6 et les deux peptides d'espacement Sp1 et Sp2. Son clivage s'effectue par la protéase virale et donne naissance aux deux protéines p41 (MA-CA-Sp1) et p15 (NC-Sp2-p6). La protéine p41 sera clivée en p17 (MA) et p25 (CA-Sp1) qui génère les deux protéines p24 (CA) et p2 (Sp1). D'autre part, la protéine p15 est clivée en p6 et p9 (NC-Sp2) qui se clive en p7 et p1 (Sp2).

La Matrice (MA)

La matrice p17 est constituée de 132 aa et est présente à l'extrémité N terminale de Gag. Sa structure tridimensionnelle a été identifiée par la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie aux rayons X (**Figure 6**). Elle est composée de cinq hélices α et d'une région basique formée d'un feuillet β à trois brins. Quatre hélices forment un domaine central globulaire qui est protégé par le feuillet β , alors que la cinquième hélice est située à l'extrémité C terminale de la protéine et permet la connexion avec la CA (Caccuri et al., 2016). Elle se caractérise par la présence d'un groupe myristylé au niveau de son extrémité C terminale et d'une région hautement basique HBR (Highly Basic Region). Le groupe myristylé peut se présenter sous deux conformations : la forme séquestrée où il se trouve au sein du domaine globulaire hydrophobe de MA, et la forme exposée qui est induite par l'interaction de la région HBR, riche en lysines, avec des phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique (MP) tels que le phosphatidylinositol-(4,5) -biphosphate (PI(4,5)P2), déclenchant son ancrage dans la MP (Saad et al., 2007). Son insertion dans la MP déclenche le tri des lipides environnants et leur fusion avec des microdomaines riches en tétraspanines TEM (Tetraspanin-Enriched Microdomains) pour la préparation à l'assemblage et le relargage des particules virales (Dahmane et al., 2019; Hogue et al., 2011; Monje-Galvan and Voth, 2020). D'autre part, la région HBR possède des sites d'interaction avec des ARNt cytosoliques. Les interactions MA-PI(4,5)P2 et les acides nucléiques régulent l'ancrage de Gag dans la MP (Chukkapalli et al., 2010). De plus, MA est impliquée dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les particules virales. Ceci est dû à l'insertion de la queue cytoplasmique de gp41 dans le trou central formé par les trimères de MA (Alfadhli et al., 2019; Eastep et al., 2021).

Les particules virales immatures présentent une MA avec une forme hexagonale peu ordonnée formée par des trimères assemblés par leurs extrémités N terminales (Qu et al., 2021). Lors de la maturation des virions, MA se réarrange et se rassemble en trimères par les domaines HBR pour former une structure hexagonale ordonnée.

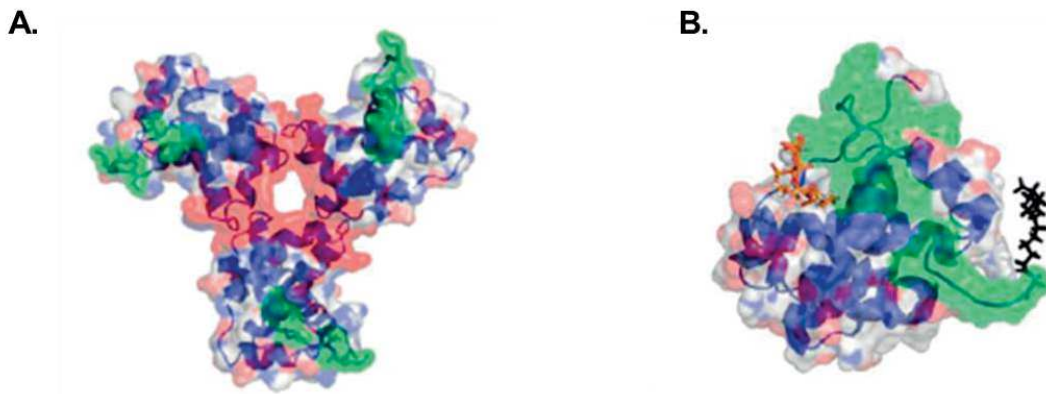


Figure 6: Structure tridimensionnelle d'un trimère du domaine MA du VIH-1 et son interaction avec les groupes PI(4,5)P2

A. Les trois sous-unités du trimère MA sont constituées chacune par les hélices α et les feuillets β (en bleu et rose). Elles forment un domaine central globulaire dans lequel le groupe myristylé est séquestré. **B.** Suite à l'interaction du trimère MA avec les phospholipides PI(4,5)P2 de la MP, le groupe myristylé est exposé (en noir) (D'après (Bell and Lever, 2013)).

La Capside (CA)

La capsid p24 est constituée de 231 aa et contient un domaine N terminal (NTD) et un domaine C terminal (CTD). Le premier comporte sept hélices α et une structure d'épingle à cheveux β , et le second est constitué de quatre hélices α et d'une hélice 3_{10} liant les deux domaines l'un à l'autre. *In vitro*, la capsid forme des structures en tubes hexamériques qui ressemblent fortement aux structures coniques des particules virales matures (**Figure 7**). Ces tubes sont constitués d'un anneau central formé par les NTDs et d'un anneau externe formé par les CTDs qui relient les hexamères entre eux (Lu et al., 2020; Mattei et al., 2016). Dans les virions matures, le cœur viral est constitué d'environ 1000-1500 monomères de capsid qui s'assemblent pour former une structure conique de type fullerène. Le CTD possède deux régions essentielles et indispensables pour la dimérisation de la protéine : la première région est à l'interface dimérique avec les deux résidus Trp184 et Met185 dont leur mutation bloque la dimérisation. La deuxième région est constituée d'un segment de 20 résidus, nommé MHR (Major Homology Region), qui est fortement conservé parmi les rétrovirus et qui intervient à l'interface NTD-CTD assurant ainsi un assemblage correct et stable pour la réplication virale (Chen, 2016).

La capside peut interagir avec des facteurs cellulaires qui affectent le cycle de réplication viral. Elle s'associe avec différents composants du cytosquelette cellulaire tels que la protéine associée aux microtubules MAP1 et la protéine de liaison cytoplasmique CLIP170 qui permettent le transport rétrograde de la capside vers le noyau. D'autre part, CA est capable d'interagir avec la protéine TRIM5 α (Tripartite motif) qui induit sa décapsidation prématurée et bloque le cycle viral à l'étape de la transcription inverse (Engelman, 2021). Enfin, l'interaction de la cyclophilin A (CypA) cellulaire avec CA stabilise cette dernière et induit une infectivité virale efficace (pour revue: (Sokolskaja et al., 2004)).

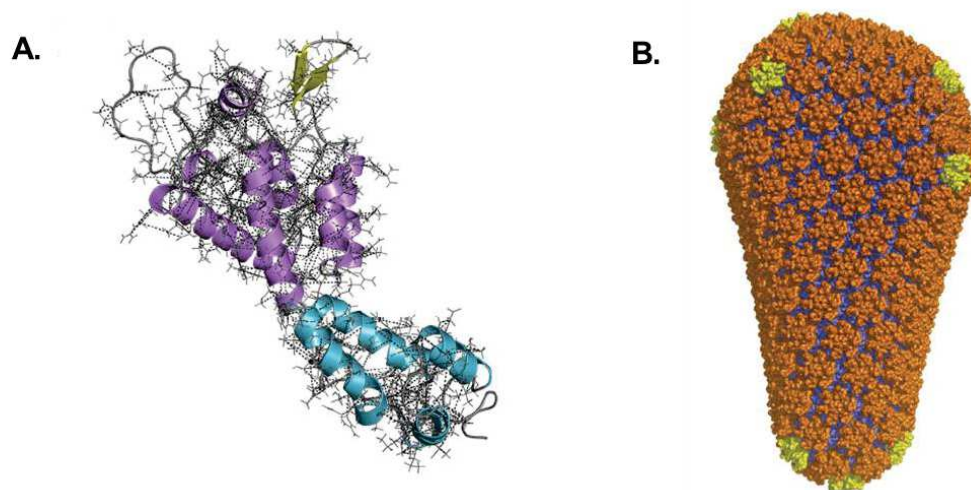


Figure 7: Structure tridimensionnelle du domaine CA et architecture de la capside mature du VIH-1.

A. Le domaine CA est constitué des sept hélices α du domaine N-terminal (en mauve), du feuillet β (en jaune), de la structure en boucle (en gris) et des hélices du domaine C-terminal (en bleu cyan) (D'après Lu et al., 2020). **B.** Structure de la capside conique mature du VIH-1 constituée de 1056 sous-unités de CA. Les dimères, pentamères et hexamères sont représentés en couleur bleu, jaune et orange, respectivement (D'après (Pornillos et al., 2011)).

Le peptide SP1

Le peptide SP1 est constitué de 14 aa et est fortement conservé parmi les différents groupes du VIH-1. Il assure la liaison entre les domaines CA et NC : il se réarrange en hélice α avec le CTD de CA et se regroupe dans un faisceau à six hélices au sein des hexamères de CA connectant celle-ci à NC (**Figure 8**). Des mutations au niveau de la jonction CA-SP1 et de ses quatre premiers résidus perturbent les

interactions Gag-Gag et empêchent un assemblage correct générant ainsi des particules virales immatures (Datta et al., 2011; Fontana et al., 2016). Le clivage au niveau de la jonction CA-SP1 est nécessaire pour la condensation des protéines CA lors de la maturation (Datta et al., 2016; Wright et al., 2007).

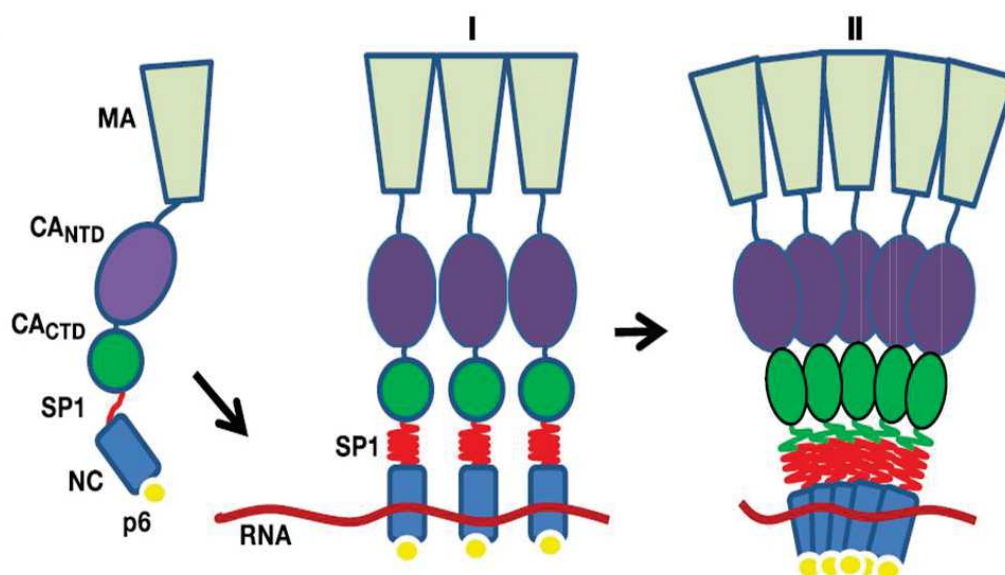


Figure 8: Illustration du réarrangement conformationnel du domaine SP1 lors de l'assemblage du VIH-1.

Lorsque plusieurs molécules Gag interagissent avec une molécule d'ARNg, leur concentration augmente et le domaine SP1 se réarrange en hélice (I). Ce changement conformationnel se propage dans le domaine CA induisant la formation d'une particule sphérique immature (D'après (Datta et al., 2016)).

La nucléocapside NC

La nucléocapside NC (NCp7) est constituée de 55 aa fortement basiques. Elle comprend deux doigts de zinc (ZF1 et ZF2) dont chacun présente une séquence conservée $CX_2CX_4HX_4C$ où X représente n'importe quel aa. Cette séquence est connue sous le nom du motif CCHC qui fixe les ions Zn^{2+} avec une grande affinité ($K_a \sim 10^{12} - 10^{14} M^{-1}$). La structure 3D de la protéine a été étudiée par NMR et révèle deux régions flexibles N- et C- terminales, et une séquence de liaison constituée de sept acides aminés (RAPRKKG) reliant les deux doigts de zinc (Mély et al., 1996; Musah, 2004; Summers et al., 1992) (**Figure 9**). La région entre les deux doigts de zinc forme un plateau hydrophobe qui est constitué de plusieurs résidus importants pour la

maturation des particules : Val12, Phe16, Ile24 et Ala25 pour le ZF1, et Trp37, Gln45 et Met46 pour le ZF2. L'orientation des ZFs et la présence du plateau hydrophobe sont essentiels pour l'interaction avec les acides nucléiques. NCp7 interagit par son hélice 3₁₀, formée par les résidus Lys³ à Arg¹⁰, avec la tige en boucle SL3 du signal d'encapsidation de l'ARNg, psi (pour revue (Mouhand et al., 2020)).

Elle permet la sélection de l'ARNg parmi le pool d'ARN cellulaires ainsi que son encapsidation dans les nouvelles particules virales en formation. Il s'agit donc d'une protéine chaperonne qui protège le dimère génomique et lui confère une conformation thermodynamique hautement stable (Post et al., 2016). Son interaction avec l'ARNg induit l'oligomérisation cytoplasmique de Gag suivi par son transport jusqu'à la MP (El Meshri et al., 2015; Klingler et al., 2020).



Figure 9: Structure tridimensionnelle du domaine NC du VIH-1.

NC est constituée de deux régions flexibles N- et C- terminales (en rouge) et une séquence de liaison de sept acides aminés (en rouge) qui relie les deux doigts de zinc (en bleu) (D'après (Summers et al., 1992)).

De même, NCp7 a la capacité d'interagir avec différentes protéines cellulaires telles que Tsg101 du système ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Chamontin et al., 2015) induisant ainsi le bourgeonnement par la coopération avec le domaine p6. Cette interaction inhibe la rétrotranscription virale lors des phases tardives d'assemblage des virions, empêche la génération des particules virales contenant de l'ADN viral (Chamontin et al., 2015). D'autre part, en se liant à Staufen1, ABCE1, BRO1 et divers facteurs, la NC est impliquée dans d'autres étapes de l'assemblage viral une fois associée avec l'ARNg (pour revue : (Klingler et al., 2020))

N'oublions pas l'implication de NCp7 dans la transcription inverse en prolongeant la durée de vie du complexe transcriptase inverse (RT) – acides nucléiques et qui induit par suite l'avancement de la réaction et la protection de l'ADN contre la formation des structures secondaires. Ceci permet la génération d'un ADN complet flanqué par les régions LTRs (Grohmann et al., 2008; Mougél et al., 2009).

Le peptide SP2

Le peptide SP2 est constitué de 16 aa et est caractérisé par deux résidus Pro en position 439 et 445 hautement conservés entre les différents sous-types du VIH-1. Leur substitution par des résidus Leu réduit la stabilité de l'ARN encapsidé (Bell and Lever, 2013) ainsi que l'incorporation de Gag-Pol dans les virions immatures (Hill et al., 2007). Par contre, sa délétion n'induit pas de changements dans la morphologie de la capside mature ce qui montre que ce peptide n'est pas un élément essentiel pour la maturation structurale et l'infectivité virale (de Marco et al., 2012).

La protéine p6

La protéine p6 est constituée de 52 aa et est située à l'extrémité C-terminale de Gag. En solution, elle montre une structure en double hélice : l'hélice 18 adjacente au site d'interaction de la protéine Tsg101 et l'hélice 19 qui constitue la région d'interaction avec les protéines ALIX et Vpr (**Figure 10**).



Figure 10: Structure tridimensionnelle du domaine p6 du VIH-1 et son interaction avec les composants du système cellulaire ESCRT.

Le domaine p6 interagit par son motif PTAP avec la protéine cellulaire TSG101 (en orange, à droite) et par son motif LYPLTSL avec la protéine ALIX (en orange, à gauche) (D'après (Bell and Lever, 2013)).

Elle est impliquée dans les étapes tardives du cycle viral et plus précisément dans le relargage viral (Dussupt et al., 2009). Des mutations des résidus Pro-10/11 et des 7 résidus Glu induisent un bourgeonnement incomplet et une rétention des particules virales immatures à la MP (Friedrich et al., 2016; Gottlinger et al., 1991). Le bourgeonnement est assuré par deux domaines de p6 dits « tardifs » : PTAP et LYPLTSL qui lient Tsg101 et ALIX, respectivement. La protéine est également impliquée dans la sélection de l'ARNg et de son interaction avec Gag durant l'assemblage (Dubois et al., 2018). De plus, p6 s'associe avec le peptide SP2 et se replie sur NCp7 pour favoriser les liaisons non-spécifiques avec l'ARNg (Mouhand et al., 2018). De même, elle est impliquée dans l'incorporation de Vpr dans les particules néoformées. Par contre, à l'entrée dans la cellule hôte les deux protéines p6 et Vpr disparaissent (Wanaguru and Bishop, 2021).

- La polyprotéine Env

Le gène *env* code pour la polyprotéine gp160 de 160 KDa qui est synthétisée dans le réticulum endoplasmique. Celle-ci est clivée dans l'appareil de Golgi par deux convertases cellulaires, furine et PC6. Ce clivage donne naissance à la protéine de surface (SU, **gp120**) et la protéine transmembranaire (TM, **gp41**) qui restent liées de façon non covalente par les interactions entre des séquences N- et C-terminales de la gp120 et la boucle à liaison disulfure de la gp41 (Lindemann et al., 2013; Murphy and Saad, 2020). Ces deux glycoprotéines forment des trimères d'hétéromères et sont impliquées dans l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte. La protéine gp120 assure l'interaction avec le récepteur CD4 exprimé à la surface cellulaire. Elle est composée de cinq domaines conservés (C1-C5) et cinq autres domaines variables (V1-V5) dont la région V3 contribue au choix du corécepteur (CCR5 / CXCR4). La protéine gp40 est impliquée dans la fusion des membranes virales et cellulaires suite à l'interaction gp120- CD4 (Ono and Freed, 2001).

b. Les protéines non structurales

Les enzymes virales sont produites suite au clivage de la polyprotéine Gag-Pol ou Pr160^{Gag-Pol} par la protéase virale. Le précurseur Pol, codé par le gène *pol*. Son clivage génère la **transcriptase inverse** (RT), l'**intégrase** (IN) et la **protéase** (PR). La RT est un hétérodimère constitué des deux sous-unités p51 et p66. Chacune contient une activité polymérase et p51 possède en plus une activité RNaseH. La RT est impliquée dans la synthèse de l'ADN double-brin à partir de l'ARNg (Baltimore, 1970). IN de 32 KDa est constituée de trois domaines : le domaine N-terminal qui favorise la multimérisation de la protéine nécessaire pour l'intégration, le domaine central responsable de l'activité catalytique et le domaine C-terminal qui se lie à l'ADN et qui est impliqué dans la stabilité du complexe ADN cellulaire-ADN viral (Delelis et al., 2008). La troisième enzyme est la PR, de 15KDa, qui est active sous forme dimérique et qui est impliquée dans le clivage des polyprotéines Gag et Gag-Pol générant ainsi des particules virales matures et infectieuses (Frankel and Young, 1998; Gulnik et al., 2000).

c. Les protéines régulatrices

Tat et Rev sont codées par des ARNm issus de l'épissage de l'ARNg. **Tat** (transactivator of transcription) est une protéine de 86 aa impliquée dans la progression de la transcription. En se fixant sur la séquence TAR (trans-activating response element), située dans la région 5'-LTR de l'ARNg, elle augmente le taux de transcription des ARN messagers viraux de 100 fois (Frankel and Young, 1998).

Rev (Regulator of viral gene expression) est une protéine de 116 aa qui se fixe à la séquence RRE (Rev Response Element) de l'ARNg située au niveau du gène *env* et qui permet l'export nucléaire des transcrits viraux non-épissés ou partiellement épissés. Ce mécanisme s'effectue via la voie cellulaire CRM1-dépendante par la reconnaissance du signal d'export nucléaire riche en résidus Leu (NES) de Rev par la protéine cellulaire CRM1, empêchant ainsi le recrutement de TAP/NXF1 (Taniguchi et al., 2014).

La protéine **ASP** (Antisens protein) codée par le gène antisens est considérée une protéine régulatrice. Elle présente une similarité avec la protéine antisens HBZ de HTLV. C'est une protéine hydrophobe de 189 aa associée à la MP et incorporée dans l'enveloppe virale (Affram et al., 2019). ASP induit l'autophagie en interagissant avec le facteur cellulaire p62. Elle est également impliquée dans l'entrée du virus dans la cellule cible (Gholizadeh et al., 2021). Elle est considérée comme un épitope reconnu par les lymphocytes T CD8+ induisant ainsi leur activation (Bet et al., 2015).

d. Les protéines auxiliaires

Le VIH-1 possède quatre protéines régulatrices qui jouent un rôle important dans l'évasion du système immunitaire : Nef, Vif, Vpr et Vpu

Nef (Negative Factor) est une protéine de 27 KDa qui présente une extrémité N myristylée lui permettant son association avec le côté cytosolique des membranes plasmiques cellulaires (Pereira and daSilva, 2016). L'infectivité causée par Nef dépend de son interaction avec la GTPase Dynamine-2 qui est un régulateur essentiel de l'endocytose médiée par la clathrine. Elle induit ainsi la dégradation du CD4

(Heigele et al., 2014). Elle est connue par son rôle immunomodulateur en agissant sur les différentes cellules immunitaires. Elle diminue l'expression du CMH-1 ainsi que l'activité cytotoxique et la production de l'IFN- γ par les CD8 $^{+}$. De plus, elle protège les macrophages de l'apoptose provoquant ainsi la formation de réservoirs viraux (Foster and Garcia, 2008; Quaranta et al., 2009).

Vif (Virion Infectivity Factor) est une protéine cytoplasmique de 24 KDa. Elle empêche l'incorporation de la protéine antivirale APOBEC3G dans les particules virales. Lorsqu'elle est présente dans les virions, APOBEC3G induit des substitutions dC à dU au niveau du brin d'ADN (-) formé lors de la transcription inverse bloquant la réplication du virus. Vif induit la polyubiquitination et la dégradation protéasomique de APOBEC3G (Goila-Gaur and Strebel, 2008; Kremer and Schnierle, 2005). Le complexe qui est utilisé pour sa dégradation est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M (Salamango and Harris, 2021).

Vpr (Viral protein R) est une protéine de 12.7 KDa qui alterne entre le cytoplasme et le noyau, et permet l'import nucléaire du complexe de préintégration (PIC) nécessaire à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Zhao and Bukrinsky, 2014). De plus, elle induit la transcription du génome viral par la translocation nucléaire de NF-KB et la fixation de ce dernier au niveau de la région LTR (Zhao et al., 2011). Enfin, elle provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en interagissant avec la protéine CCDC137 (Coiled-coil domain containing 137) impliquée dans la division cellulaire (Zhang and Bieniasz, 2020).

Vpu (Viral protein U) est un oligomère de 81 aa constitué de deux domaines : un domaine transmembranaire de 27 aa qui interagit avec la protéine antivirale tétherine et favorise le relargage des particules virales (Guo and Liang, 2012). Le domaine cytoplasmique est constitué de 54 aa et contient deux résidus Ser qui, une fois phosphorylés, induisent la dégradation de CD4 dans le RE (Nomaguchi et al., 2008). De plus, elle réduit l'expression d'une protéine cellulaire de surface Tim-3 (T cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3) qui est impliquée dans la régulation de l'activation des lymphocytes T et l'inhibition du relargage viral (Prévost et al., 2020).

2.4. Cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 débute par la fixation du virus sur le récepteur des cellules cibles, les macrophages et les lymphocytes T. On considère deux grandes parties : les étapes précoces qui se terminent par l'intégration du virus dans le génome cellulaire, suivie des étapes tardives qui comprennent l'expression du VIH et se terminent avec la formation et la libération des particules virales matures et infectieuses (**Figure 11**). La durée du cycle réplcatif varie entre les cellules et dure en moyenne 42h (Holmes et al., 2015).

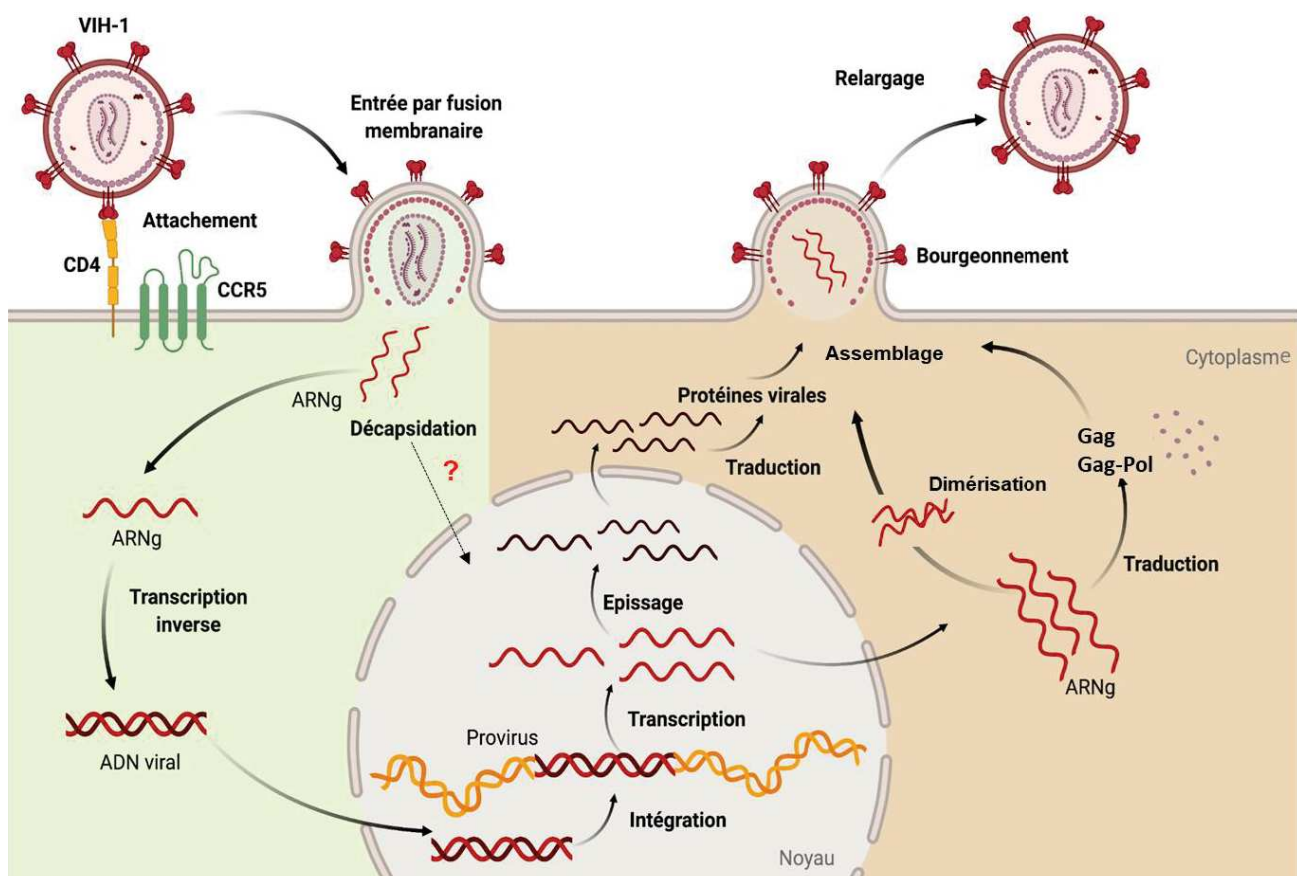


Figure 11: Schéma du cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle réplcatif du VIH-1 comporte deux grandes parties. Les étapes précoces (en vert) comprennent l'entrée du virus, sa décapsidation, la production de l'ADN viral par la transcription inverse et son intégration dans le génome cellulaire (provirus). Le schéma est présenté selon l'hypothèse que la décapsidation et la transcription inverse se déroulent dans le cytoplasme. Ces étapes sont suivies par les étapes tardives (en orange). La transcription donne naissance au transcrit primaire qui sera soit épissé et exporté vers le cytoplasme pour exprimer les protéines virales soit directement exporté (sans épissage) pour être traduit en polyprotéines Gag et Gag-Pol ou bien pour se dimériser pour être encapsidé et servir de génome. Les étapes tardives se terminent par l'assemblage des différents composants viraux, le bourgeonnement et le relargage des particules virales. La maturation avec la formation des protéines matures confère au virus son caractère infectieux.

a. Etapes précoces

○ Attachement aux cellules cibles et entrée

L'attachement et la fusion du VIH-1 avec la cellule hôte, comme pour tous les virus enveloppés, est l'étape clé de l'infection. Elle débute par la fixation de la gp120 sur le récepteur CD4 exprimé à la surface des cellules cibles. Seule cette étape est insuffisante pour induire l'entrée du virus dans la cellule. Elle est suivie par la fusion des deux membranes permettant la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire. Il est connu que deux membranes qui sont à proximité l'une de l'autre présentent des forces répulsives et génèrent des barrières cinétiques empêchant leur fusion. Dans le cas du VIH-1, ces barrières sont surmontées en modifiant la conformation de gp120 et plus spécifiquement au niveau de la boucle V3 (Chen, 2019). Ce changement conformationnel expose un site de liaison pour les corécepteurs CXCR4 et CCR5 exprimés à la surface des lymphocytes T et des macrophages / cellules dendritiques, respectivement. Le complexe CD4-gp120-corécepteur favorise un changement de la conformation de gp41 qui résulte en une translocation du peptide de fusion et son insertion dans la membrane cellulaire. Des réarrangements séquentiels au niveau de gp41 impliquent son repliement pour créer un faisceau à six hélices représentant le pore de fusion et qui permet ainsi l'entrée du virus (Wilén et al., 2012) (**Figure 12**). Il a été démontré que CD4 et CCR5/CXCR4 se localisent avec des marqueurs responsables de l'activité dynamique de la membrane cellulaire tels que l'actine et l'eitrine, et présentent une mobilité latérale au sein de la membrane. Ce mécanisme nécessite la présence du cholestérol étant donné que sa délétion inhibe la localisation du récepteur au niveau de ces régions (Steffens and Hope, 2003).

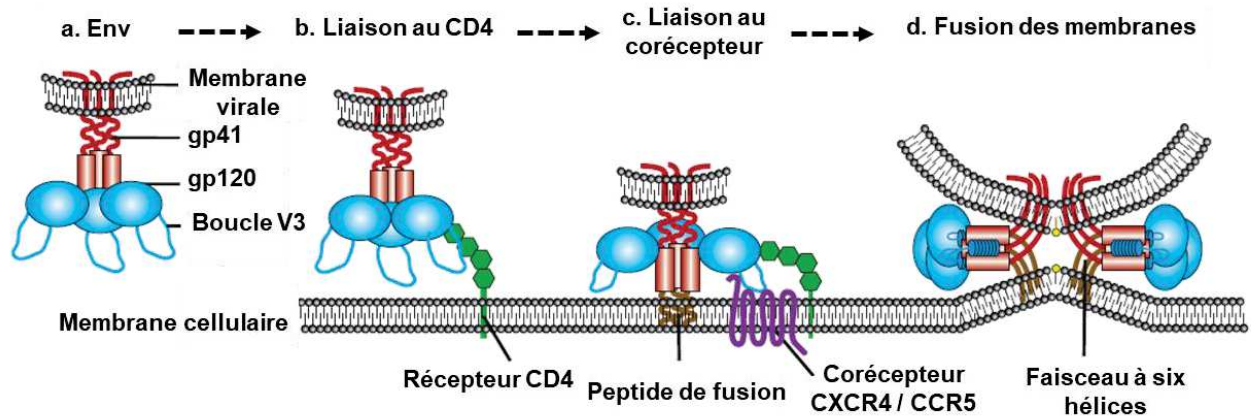


Figure 12: Entrée du VIH-1 dans la cellule hôte

L'entrée s'effectue via la protéine d'enveloppe constituée de la glycoprotéine transmembranaire gp41 et la glycoprotéine de surface gp120 (a). L'entrée s'effectue en trois étapes: après la liaison de gp120 au récepteur cellulaire CD4 (b), des changements conformationnels au niveau de sa boucle V3 permettent la liaison aux corécepteurs CXCR4 ou CCR5 (c). Ensuite, la fusion des membranes cellulaire et virale s'effectue après l'ancrage du peptide de fusion dans la MP et la formation d'un faisceau à six hélices qui déclenche la libération de la capside virale dans le cytoplasme (Adapté de (Wilén et al., 2012)).

- Décapsidation et transcription inverse

La décapsidation

La décapsidation correspond à la dissociation de la capside p24 dans la cellule. Elle débute par l'ouverture partielle de CA suivie par la dissociation de ses monomères. Elle permet la libération de l'ARNg permettant sa transcription inverse et la synthèse de l'ADN, une étape indispensable pour son intégration dans le génome cellulaire. Ainsi, une décapsidation prématurée affecte la réplication virale et l'infektivité. Elle dépend de divers facteurs cellulaires qui régulent l'import nucléaire et la transcription inverse, et qui varient selon les types cellulaires (Ambrose and Aiken, 2014). Le cadre spatio-temporel dans lequel cet évènement a lieu est encore sujet à controverses.

Initialement, les premiers modèles développés étaient en faveur d'une décapsidation précoce dès l'entrée du virus et ayant lieu à proximité de la MP. Elle

correspond à une dissociation complète des molécules de p24 suivie d'une transcription inverse cytoplasmique (Suzuki and Craigie, 2007). Plus tard, des études montrent qu'une décapsidation partielle débute dans le cytoplasme et se déroule simultanément avec la transcription inverse menant à la formation du complexe de transcription inverse (RTC) (Fassati and Goff, 2001; Karageorgos and Burrell, 1993). La décapsidation est facilitée par les protéines cellulaires dynéine et kinésine 1 (Lukic et al., 2014; Malikov and Naghavi, 2017) et par le cofacteur transportine-1 (Fernandez and Arhel, 2020; Fernandez et al., 2019). Plus récemment, d'autres études ont montré que la capsid reste intacte tout au long de son trafic cytoplasmique pour atteindre la membrane nucléaire et être transloquée dans le noyau, toujours sous sa forme intacte, où elle recrute la protéine cellulaire CPSF6 au niveau des sites de transcription hautement actifs, nommés SC35 (Selyutina et al., 2020). Ces études suggèrent que la transcription inverse précède de moins de deux heures la décapsidation qui, elle-même, se déroule avant l'intégration (Burdick et al., 2020). La décapsidation a lieu à proximité des sites d'intégration du génome cellulaire (Dharan et al., 2020), et par cassure de la capsid et non pas par un désassemblage de ses sous-unités. Ceci est démontré par la visualisation des fragments vides de la CA indiquant la libération du complexe de réplication (Zila et al., 2021). Par contre, d'autres études montrent que la décapsidation démarre quand la capsid atteint les pores nucléaires et est suivie par la transcription inverse (Francis et al., 2020).

La transcription inverse

La transcription inverse est le processus par lequel l'ARNg est copié en ADN pour être intégré dans le génome de la cellule infectée (**Figure 13**). Ce mécanisme est catalysé par la RT qui possède une activité ADN polymérase ARN/ADN dépendante qui forme l'ADN simple brin négatif, et une activité RNaseH qui dégrade la matrice ARN du complexe ARN-ADN. Cette réaction débute par la fixation de l'extrémité 3' de l'amorce cellulaire ANRt sur la séquence complémentaire PBS de l'extrémité 5' de l'ARNg pour former le complexe d'initiation de la transcription inverse (RTIC). Des expériences *in vitro* ont montré que l'initiation de la transcription inverse est un processus lent qui s'accélère suite à l'ajout des six premiers dNTP à l'extrémité 3' de l'ARNt (Krupkin et al., 2020; Lanchy et al., 1998). Après la synthèse de l'ADN simple

brin négatif, le complexe ADN-ARN est clivé au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN viral exposant ainsi l'ADN. Celui-ci est transféré à l'extrémité 3' de l'ARN viral et poursuit sa synthèse simultanément avec la dégradation de la matrice d'ARN du complexe ADN/ARN. Une séquence de l'ARNg riche en purine (PPT: polypurine tract) est résistante à cette dernière et agit comme une amorce pour l'initiation de la synthèse de l'ADN (+) jusqu'aux premiers 18 nucléotides de l'ARNt₃^{Lys}. Le second transfert du brin d'ADN (+) assure la liaison des deux brins d'ADN par leurs régions PBS permettant leur extension et la synthèse de l'ADN double brin (Hu and Hughes, 2012). Il est à noter que les ARN épissés du VIH-1 pouvaient également être rétrotranscrits avec la même efficacité que l'ARNg, sans qu'on en comprenne encore les conséquences (Houzet et al., 2007a).

Il existe un contrôle spatio-temporel complexe de la transcription inverse. En effet, une interaction entre RT et IN s'est avérée importante pour l'initiation de la réaction étant donné que des mutations au niveau de la région C-terminale de l'IN qui interagit avec la RT (liée ou pas à l'ADN viral en formation) génère des clones viraux non infectieux vu l'incapacité de synthétiser l'ADN bicaténaire (ADNc) (Tekeste et al., 2015). D'autre part, NCp7 est un acteur important dans le contrôle spatio-temporel de la synthèse d'ADNc. En effet, des mutations au niveau de ses ZFs induisent une transcription inverse précoce durant les étapes tardives de la réplication qui conduit au relargage de particules virales contenant une quantité 100x plus élevée d'ADNc (Houzet et al., 2008; Mougél et al., 2009). De plus, la NCp7 reste intacte durant son transport tout au long du cytoplasme jusqu'au noyau. Ceci vient en faveur avec l'hypothèse que la décapsidation est un processus rapide (<20min) qui s'effectue dans le noyau à proximité des sites d'intégration et qui suit la transcription inverse (Burdick et al., 2020; Burdick and Pathak, 2021).

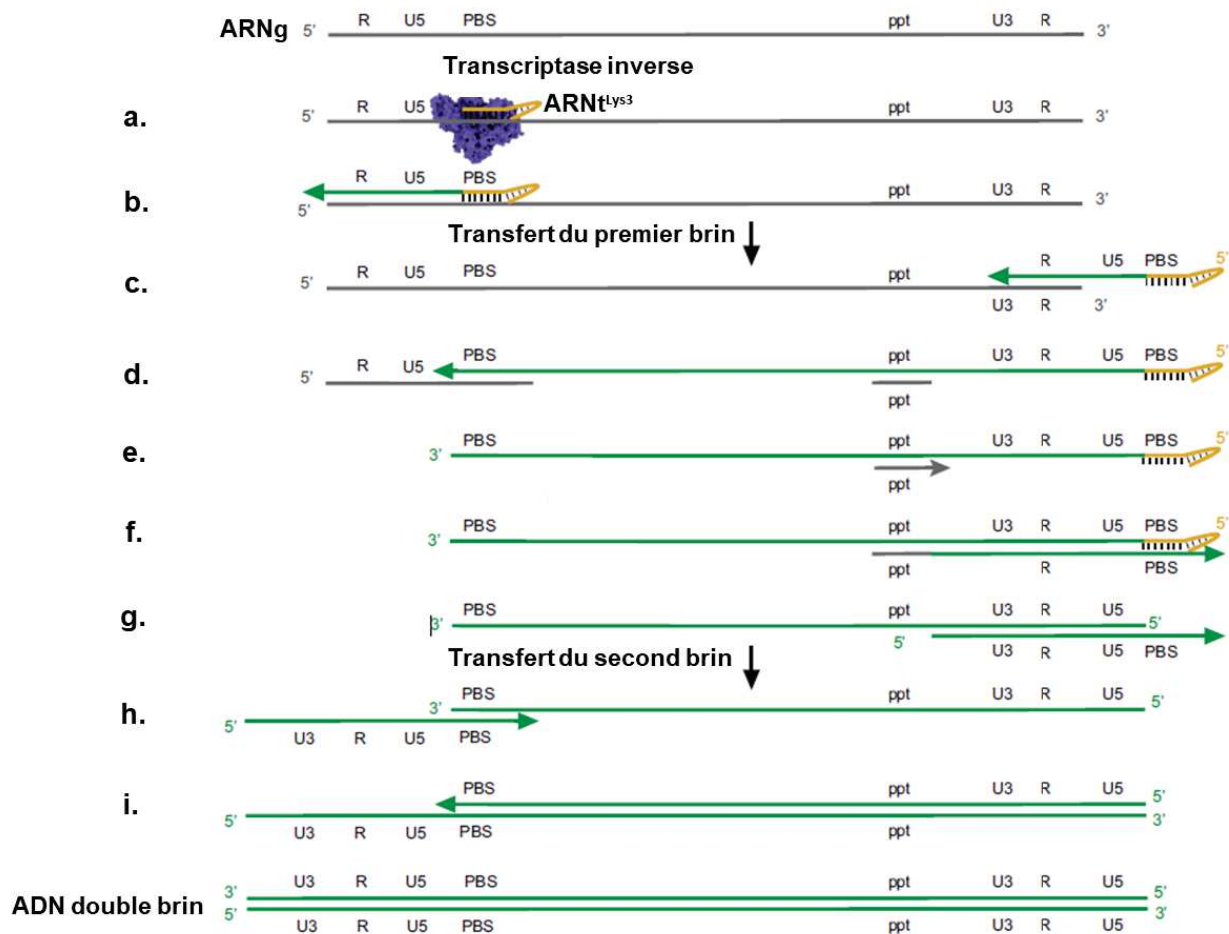


Figure 13: Etapes de la transcription inverse de VIH-1

La transcription inverse du VIH-1 débute par la fixation de la transcriptase inverse et de l'extrémité 3' de l'amorce cellulaire ARNt^{Lys} au niveau de la séquence PBS de l'ARNg (a). L'enzyme initie la synthèse du brin d'ADN (-) jusqu'à atteindre la région R de l'extrémité 5' du l'ARN (b). A ce moment s'effectue le transfert du premier brin au bout de la séquence 3'UTR viral (c) et continue la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Celle-ci s'effectue simultanément avec la dégradation de la matrice d'ARN du duplex ADN/ARN par l'activité Rnase H de la RT à l'exception de la région riche en purine (ppt) (d). La RT se sert de la région ppt comme amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+) (e) qui sera synthétisé jusqu'à la région PBS (f). Ensuite, l'ARN viral est complètement dégradé (g) et le second transfert s'effectue à l'aide des séquences PBS et permet la poursuite de la synthèse de l'ADN (+) (h). Les deux régions PBS des brins d'ADN (-) et (+) permettent l'extension des deux brins d'ADN (i) et la synthèse complète de l'ADN viral double brin (Adapté de (Krupkin et al., 2020)).

- Intégration du génome viral

Une fois l'ADNc formé, il est intégré dans le génome cellulaire via le complexe de préintégration (PIC). Celui-ci contient l'ADNc, des protéines virales (RT, IN, MA, CA, NC et Vpr) et d'autres facteurs cellulaires tels que LEDGF/p75 (chromatin-associated cellular protein Lens Epithelium-Derived Growth Factor) et INI1 (INtegrase Interactor protein 1) (Engelman and Singh, 2018; Grandgenett et al., 2015; Maillot et al., 2013). L'IN catalyse deux réactions (**Figure 14**) : la première consiste à ôter deux nucléotides à chaque extrémité 3' de l'ADNc et est suivie par leur liaison covalente avec l'extrémité 5' de l'ADN cellulaire au niveau d'une liaison phosphodiéster. Les deux nucléotides non appariés de l'ADNc sont enlevés par des enzymes cellulaires de réparation de l'ADN pour compléter l'intégration (Craigie and Bushman, 2012). Ensuite, l'intégration s'effectue au niveau des sites actifs de transcription. Il s'agit des régions d'euchromatine proches du pore nucléaire vers lesquelles l'ADNc est guidé à l'aide du cofacteur transcriptionnel p75, nommé aussi LEDGF, ce qui permettra une réplication virale efficace (Ciuffi and Bushman, 2006).

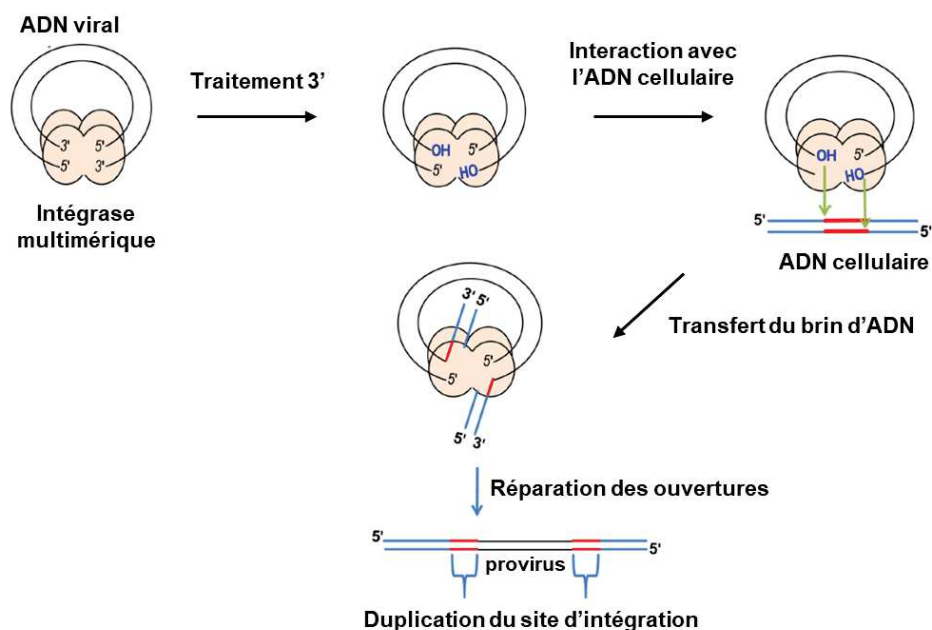


Figure 14: Intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire

Après multimérisation, l'IN clive les deux nucléotides de chaque extrémité 3' de l'ADN viral pour laisser des groupements hydroxyles libres. Suivant la liaison avec l'ADN cellulaire l'IN déclenche le transfert du brin et la réparation des ouvertures qui produit une duplication de la région encadrant le provirus (Adapté de (Engelman and Singh, 2018)).

b. Etapes tardives

○ Transcription

Une fois l'ADNc intégré dans le génome cellulaire, il doit être transcrit pour former les protéines virales et établir une infection productive. Par contre, pour le virus du VIH-1 ceci n'est pas toujours le cas. En effet, le virus peut rester latent dans ce cas la répression de la transcription est causée par la condensation de la chromatine sous forme de nucléosomes empêchant l'accès aux facteurs de transcription (Colin et al., 2014; Shukla et al., 2020). Il se forme alors des réservoirs de VIH latents qui sont résistants à la thérapie antirétrovirale (ART), basée essentiellement sur l'expression du virus.

La transcription débute au niveau de la jonction entre les deux régions U3 et R par le recrutement des facteurs cellulaires Sp1, NF-KB et NFAT (Reddy and Dasgupta, 1992). Ceux-ci induisent le recrutement des histones acétyltransférases qui remodelent la chromatine et exposent la région promotrice permettant l'installation de la machinerie transcriptionnelle cellulaire au niveau du promoteur TATA box situé dans la région 5'-LTR. La fixation du TFIID induit le recrutement des cinq facteurs de transcription TFIIA, TRIIB, TFIIE, TFIIIF et TFIIH, ainsi que le complexe médiateur et l'ARN polymérase II. L'activation de la transcription s'effectue par la phosphorylation du résidu Ser5 du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. Cette réaction est catalysée par la kinase CDK7 associée au TFIIH. Ensuite, le complexe cellulaire P-TEFb est recruté par la protéine virale Tat au niveau de la région TAR de l'ARNg et assure l'hyperphosphorylation de l'ARN pol II. Ceci induit une élongation plus active et la formation des transcrits viraux complets (Ne et al., 2018).

La transcription sens est plus active que la transcription antisens qui est limitée aux premières étapes de l'infection aiguë. Le site d'initiation de la transcription antisens se situe dans la région U3 du 3' LTR entre les résidus 9441 et 9538, et le site de terminaison se situe au sein du gène *env* entre les positions 6727 et 6874 du génome viral. Les transcrits antisens ont été classés en quatre groupes : groupe I de ~10Kb, groupe II de 5.5Kb, groupe III de 3-4 Kb et groupe IV de ~2 Kb (Li et al., 2021).

- Epissage des ARNm

La transcription donne naissance à un seul transcrit primaire de 9.2 Kb dont l'épissage est finement régulé. On distingue les transcrits partiellement épissés de 4 Kb qui sont formés par un seul épissage, et les transcrits complètement épissés de 1.8 Kb qui sont multi-épissés (**Figure 15**). Un premier épissage s'effectue à partir du site donneur D1 situé à l'extrémité 5' UTR jusqu'à un des cinq sites accepteurs A1-A5 situés en aval. Il s'agit des ARNm *vif*, *vpr*, *vpu/env* et un transcrit isoforme à celui de *tat*. D'autres transcrits subissent un deuxième épissage du site donneur D4 au site accepteur A7 pour donner naissance aux ARNm *tat*, *rev*, *nef* et à de courts ARNm pour *vif* et *vpr*. D'autres épissages peuvent être effectués et font intervenir deux autres sites donneurs D2 et D3 situés en aval de D1 au sein de deux exons. De façon singulière, le transcrit primaire peut aussi échapper complètement à l'épissage et sortir dans le cytoplasme pour constituer soit l'ARNg qui est encapsidé dans les particules virales, soit l'ARNm qui est traduit en polyprotéines Gag et Pol. Toutes ces possibilités de non épissage, d'épissages partiels ou complets donnent naissance à plus de cinquante types d'ARN viraux (Emery and Swanstrom, 2021).

Premier épissage: du site donneur D1 vers l'accepteur

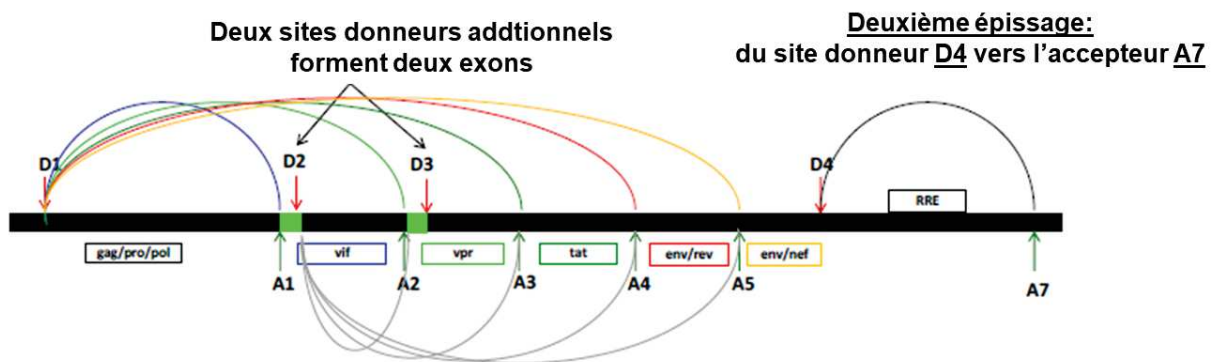


Figure 15: Etapes de l'épissage des différents transcrits du VIH-1

L'épissage débute toujours par le site donneur D1 vers un des sites accepteurs situés en aval. Les transcrits produits sont les ARNm *vif*, *vpr*, *vpu/env* et un transcrit isoforme de l'ARNm *tat*, et nommés transcrits partiellement épissés (4kb). Par contre, d'autres transcrits subissent un deuxième épissage qui s'effectue de D4 à A7. Il s'agit des ARNm *tat*, *rev* et *nef* ainsi que de courts ARNm pour *vif* et *vpr* et sont nommés transcrits complètement épissés (1.8 kb). Deux exons peuvent être présents ou sautés des ARNm vu la possibilité d'un épissage additionnel de D2 ou de D3 vers un accepteur après le premier épissage de D1 à A1 ou à A2, respectivement (Adapté de (Emery and Swanstrom, 2021)).

L'épissage est contrôlé par certaines protéines régulatrices cellulaires et virales ainsi que par la structure de l'ARNg. Il a été démontré que des mutations au niveau des sites d'interaction de différentes protéines cellulaires (SC35, SRp40) avec le site donneur peuvent augmenter ou réduire l'efficacité de l'épissage. De plus, ce mécanisme fait intervenir des protéines virales telles que Tat et Vpr (Mueller et al., 2018; Zhang and Aida, 2009). D'autre part, les séquences nucléotidiques au niveau du site donneur D1 peuvent former une structure en tige-boucle dont la déstabilisation augmente l'épissage (Mueller et al., 2015; Mueller et al., 2014).

Export nucléaire

L'export nucléaire des ARN viraux s'effectue par deux voies différentes. Les ARN non épissés et partiellement épissés présentent la séquence RRE reconnue par la protéine Rev. L'interaction Rev-RRE induit des changements structuraux de l'ARN favorisant ainsi l'assemblage de plusieurs protéines Rev. Celles-ci interagissent par leur signal d'export nucléaire (NES) riche en Leu avec le complexe cellulaire dimérique CRM1-Ran-GTP permettant ainsi l'export vers le cytoplasme (Bai et al., 2014; Booth et al., 2014). Ce mécanisme est contrôlé par la protéine Naf1 (HIV-1 Nef-associated factor 1) qui interagit avec CRM1 et induit l'export nucléaire de l'ARN non-épissé (Ren et al., 2016). La mutation du NES de Rev réduit la fonction de Naf1. L'export nucléaire des ARN complètement épissés suit la voie classique des ARNm cellulaires qui implique Tap-Nxt1 et l'hélicase Dbp5 qui appartient à la famille des protéines DEAD-box. Celles-ci utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour modifier la conformation de l'ARNm, permettant ainsi son export nucléaire (Cullen, 2005) (**Figure 16**).

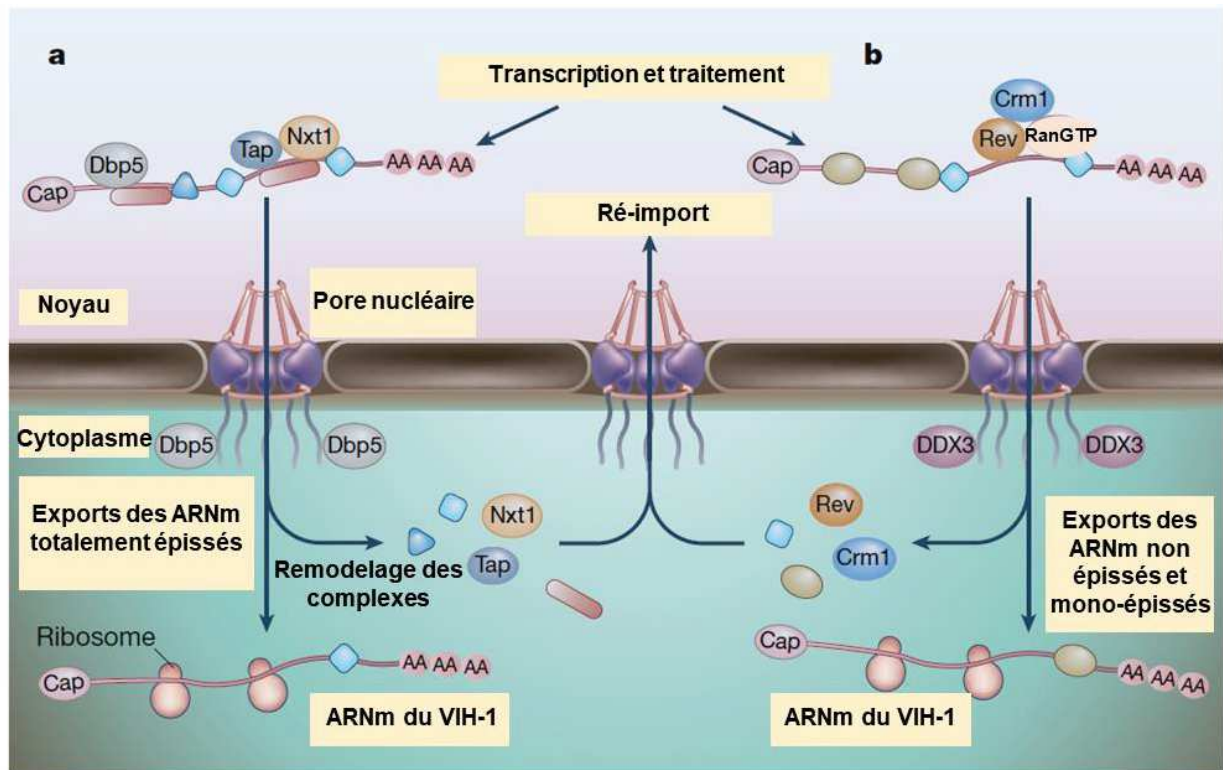


Figure 16: Export nucléaire des différents ARN du VIH-1

a. Les ARNm du VIH-1 qui sont totalement épissés s'associent aux protéines du complexe Tap/Nxt1 et à l'hélicase Dbp5 pour être ensuite exportés via le pore nucléaire dans le cytoplasme. La Dbp5 permet de remodeler les complexes et de libérer les protéines cellulaires pour leur translocation ultérieure vers le noyau. **b.** La protéine Rev traduite par l'ARNm totalement épissé se lie à la séquence RRE des ARNm viraux non épissés et mono-épissés et recrute le complexe Crm1/RanGTP afin d'exporter ces transcrits dans le cytoplasme pour être ensuite traduits (Adapté de (Cullen, 2005)).

○ Traduction

Une fois dans le cytoplasme, le VIH utilise la machinerie ribosomale cellulaire pour sa traduction et la synthèse de 16 protéines virales. La traduction débute par la liaison de la sous unité ribosomale 40S avec d'autres facteurs cellulaires au niveau de l'ARNm et sa progression tout au long du brin pour reconnaître le codon d'initiation AUG situé à l'extrémité 5'UTR. Les acides aminés ajoutés au cours de la traduction seront liés au peptide qui se forme au niveau du centre ribosomale peptidyl transférase jusqu'à ce que les ribosomes atteignent le codon stop qui induit l'arrêt de la traduction et la libération du peptide néosynthétisé (de Breyne and Ohlmann, 2018). L'efficacité

de la traduction est contrôlée par la structure et les modifications de l'ARN ainsi que par diverses protéines cellulaires telles que l'ARN Hélicase A qui induit la production des protéines virales et qui est impliquée dans l'infectivité des virus néoformés en induisant des réarrangements du complexe viral ribonucléoprotéique (RNP) pour la transcription inverse (Bolinger et al., 2010).

Les ARNm complètement épissés sont les premiers à être traduits et donnent naissance aux protéines Tat, Rev et Nef. L'ARN partiellement épissé *vpu/env* est traduit en gp160 qui est dirigée vers le RER et qui oligomérise en trimères. Une fois qu'elle atteint le Golgi, gp160 est clivée par la protéase cellulaire furine pour former les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 qui seront adressées à la MP (Checkley et al., 2011). L'ARN non-épissé forme les polyprotéines Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol}. Cette dernière est traduite par un mécanisme nommé « frameshift-1 » qui se produit dans 5% des cas et permet au ribosome de passer du cadre de lecture Gag à celui de Gag-Pol. Celui-ci utilise deux séquences *cis* situées de 200 nt en amont du site de terminaison de Gag pour produire 1 protéine Gag-Pol pour une vingtaine de protéines Gag (Karn and Stoltzfus, 2012). Le ratio Gag/Gag-Pol doit être maintenu constant pour assurer une bonne progression du cycle viral. Parmi les facteurs agissant en *trans* pour contrôler le frameshift, on distingue la protéine cellulaire nommée « Shiftless » qui se fixe à l'ARN et au ribosome en action pour inhiber ce mécanisme (Wang et al., 2019).

Le VIH-1 a réussi à développer d'autres stratégies de traduction pour assurer une expression plus importante de ses protéines. Il s'agit du mécanisme cap-indépendant qui met en jeu deux sites IRES (Internal Ribosome Entry Site) situés à l'extrémité 5' de l'ARNg et au sein du gène *gag* et qui orchestrent la traduction virale pendant que la voie cap-dépendante est inactive. L'activation de ces deux voies dépend fortement du cycle cellulaire. Durant la phase G2/M, l'hypophosphorylation du facteur d'initiation de traduction eIF4E réduit son interaction avec la région 5'-cap de l'ARNm (m⁷G). Ceci empêche la formation du complexe d'initiation favorisant ainsi la traduction par le site IRES qui ne nécessite pas eIF4E. Par contre, durant la phase G1/S le site IRES est inactif et c'est la voie cap-dépendante qui l'emporte. L'alternance entre ces différents mécanismes assure l'expression adéquate de Gag (Brasey et al., 2003; Monette et al., 2013).

- Production des particules virales

Tous les composants viraux, protéines et ARNg, doivent converger de façon synchrone vers la MP pour former de nouvelles particules. Celles-ci sortent de la cellule par bourgeonnement de la MP (**Figure 17**). La production des particules du VIH-1 est un processus complexe qui se déroule par la coordination des précurseurs des polyprotéines Gag et Gag-Pol. L'assemblage de Gag débute par son interaction avec l'ARNg induisant la dimérisation de l'ARNg et l'oligomérisation de Gag.

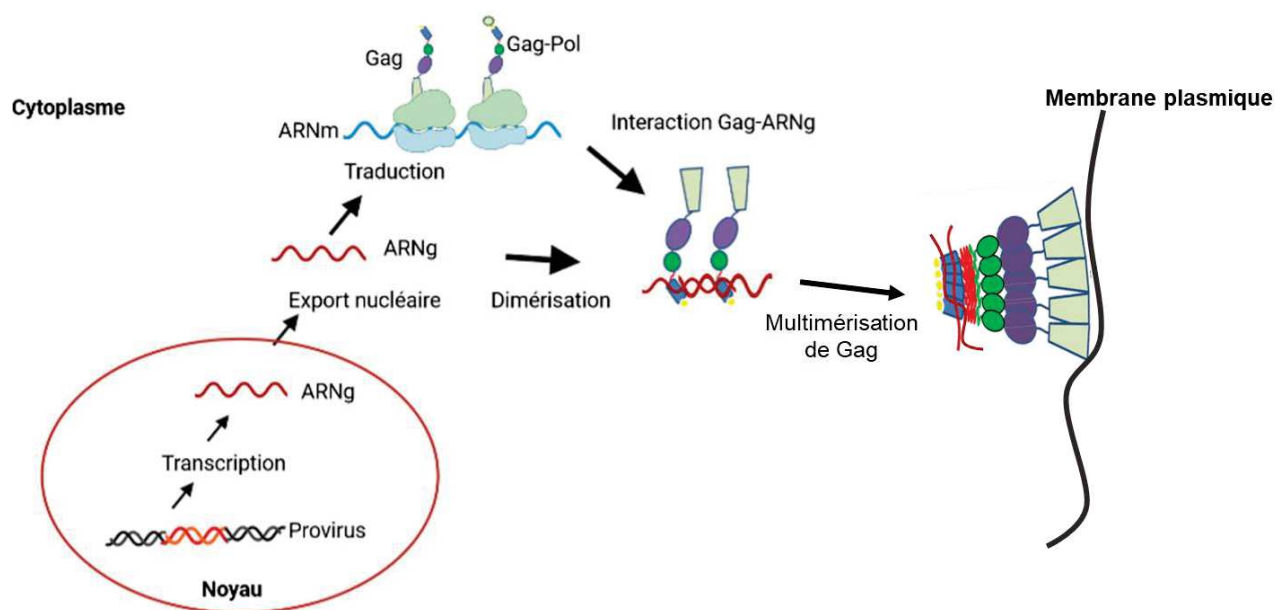


Figure 17: Représentation simplifiée des étapes de l'assemblage du VIH-1.

L'assemblage du VIH-1 s'effectue par plusieurs étapes synchrones qui mettent en jeu l'ARNg et les précurseurs Gag et Gag-Pol. Après son export vers le cytoplasme, l'ARNg est soit traduit en protéines virales (Gag et Gag-Pol) par les ribosomes, soit il se dimérise pour interagir avec un dimère de protéines Gag par leur domaine NC. Le complexe Gag-ARNg se dirige vers la MP (à l'exception pour les macrophages) où s'effectue la multimérisation de Gag.

Dimérisation de l'ARNg

La dimérisation de l'ARNg est essentielle pour l'infectivité du virus qui doit contenir 2 copies de génome. La dimérisation est un prérequis à l'encapsidation de l'ARNg dans les particules virales (Moore and Hu, 2009; Russell et al., 2004). Elle est initiée par une séquence palindromique de 6 nucléotides, appelée DIS pour Dimerization Initiation site, située à l'extrémité 5'UTR de chaque brin d'ARNg (Skripkin et al., 1994). Cette première interaction induit un alignement parallèle des deux brins d'ARN suivi par d'autres interactions intermoléculaires entre des régions riches en G qui sont situées à proximité de la région polypurine au milieu du génome pour former une structure appelée G-quartet (Piekna-Przybylska et al., 2013). L'interaction ARN-ARN fait intervenir Gag via son domaine NC. A l'aide de techniques d'imagerie ARN et de microscopies de fluorescence de super résolution, notre équipe a été la première à visualiser la dimérisation au niveau du cytoplasme (Ferrer et al., 2016). Le dimère associé à quelques molécules de Gag est ensuite transporté vers la MP et va être rejoint par des milliers de Gag pour former une nouvelle particule (Ferrer et al., 2016; Jouvenet et al., 2009). La dimérisation pourrait également s'initier au niveau de la MP (Chen et al., 2016).

Interaction de Gag-ARNg

En parallèle à son oligomérisation, quelques oligomères de Gag se condensent sur l'ARNg. Une localisation cytoplasmique du complexe Gag-ARNg et son trafic vers la MP sont confirmés par la colocalisation des deux éléments viraux observée par microscopie quantitative à fluorescence. L'augmentation de leur concentration en fonction du temps est déterminée par une augmentation du pourcentage de particules contenant l'ARNg (Hendrix et al., 2015; Jouvenet et al., 2009). Durant son trafic, le complexe ARNg-Gag subit un phénomène de condensation observé par la réduction de la distance au cours du temps entre ces deux éléments (Durand et al., 2022). Comment Gag reconnaît-elle spécifiquement l'ARNg parmi tous les ARN cellulaires et viraux épissés présents dans le cytoplasme? : Tout d'abord, il a été montré que Gag fixe avec une forte affinité les structures en tige-boucle SL1 et SL3 de la région Psi de l'ARNg (Clever et al., 1995; Ding et al., 2020). Cette interaction spécifique Gag-ARNg induit une oligomérisation de Gag plus efficace et plus rapide que lorsque Gag interagit

avec des ARN cellulaires (Comas-Garcia et al., 2016; Dilley et al., 2017). La délétion des deux tiges-boucles SL1 et SL3 réduit significativement les complexes ARNg-Gag et augmente la distance entre Gag et l'ARNg réduisant ainsi l'encapsidation de l'ARNg dans les particules néoformées (Durand et al., 2022). Par ailleurs la délétion du domaine CTD de CA réduit la stabilité des interactions entre Gag et l'ARNg. Ceci montre que les interactions entre les monomères Gag contribuent à la sélection de l'ARNg (Kutluay and Bieniasz, 2010). D'autre part, plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans la sélection de l'ARNg tels que la protéine Staufen qui est une protéine GTPase appartenant à la famille Rab. Elle est incorporée dans les virions lors de l'assemblage et elle a été détectée dans des complexes ribonucléoprotéiques contenant l'ARNg viral mais pas les ARN viraux épissés (Abrahamyan et al., 2010).

L'encapsidation de l'ARNg fait intervenir le domaine NC de Gag. Ses déterminants les plus essentiels sont les résidus basiques et deux aa aromatiques des deux doigts de zinc ZF1 et ZF2. Des mutations ou des délétions de ces régions induisent des défauts dans l'encapsidation de l'ARNg ainsi qu'un déséquilibre du ratio entre l'ARNg et les ARN épissés (Bernacchi et al., 2017; Boutant et al., 2020). De même, elles altèrent l'interaction ARNg-Gag et empêche l'oligomérisation de Gag requise pour l'achèvement de l'assemblage (Grigorov et al., 2007). Il a été démontré que ZF2 est plus impliqué dans l'interaction ARNg-Gag que ZF1 (Retureau et al., 2019). Cette interaction initiale met en jeu d'autres interactions électrostatiques avec les résidus chargés positivement du domaine MA (Kroupa et al., 2020).

Concernant l'ARNg, différents domaines de la région 5'UTR sont impliqués dans l'encapsidation. L'élément ψ contient deux séquences d'interaction avec NC dont la présence seule est suffisante pour induire la liaison de la protéine avec l'ARNg (Ding et al., 2020). De plus, il agit comme un signal de localisation subcellulaire qui transporte le complexe Gag-ARN des sites d'interaction vers les sites de bourgeonnement. Les premiers étant au niveau de la région périnucléaire et des centrioles (Poole et al., 2005). En revanche, d'autres études montrent que l'ARNg est recruté par quelques molécules Gag au niveau de la MP où s'effectue l'interaction ARN-Gag (Jouvenet et al., 2009).

L'élément ψ n'est pas le seul à être impliqué dans l'encapsidation de l'ARNg. En effet, les deux tiges boucles SL1 et SL3 de la région 5'UTR contiennent des sites

d'interaction de haute affinité avec NC. Des mutations au niveau de ces deux régions réduisent l'encapsidation de l'ARNg dans les particules virales (Didierlaurent et al., 2011; Houzet et al., 2007b).

En présence des séquences d'encapsidation défectueuses, le VIH-1 est capable d'incorporer des ARN épissés et cellulaires (Houzet et al., 2007b). Des ARN viraux épissés sont incorporés d'une façon significative dans les virions (Houzet et al., 2007b; Roy et al., 2006). De plus, les ARNt cellulaires ainsi que l'ARN 7SL et l'ARNsn U6 (Kutluay et al., 2014; Rulli et al., 2007) sont également retrouvés dans les virions. Des mutations au niveau de NC réduisent l'incorporation de l'ARNg et induisent celle des ARN épissés et des ARN 7SL / U6 (Didierlaurent et al., 2011).

Simultanément à l'encapsidation du génome, les protéines d'enveloppe s'incorporent dans les particules virales en cours de formation. Après les modifications post-traductionnelles qu'elles subissent et leur clivage en gp120 et gp41, elles seront acheminées vers la MP et exprimées à la surface de la cellule hôte pour être intégrées dans les particules virales (Freed, 2015).

Assemblage de la capside

L'assemblage des particules se poursuit par la multimérisation des oligomères Gag qui s'effectue majoritairement au niveau de la MP à l'exception pour les macrophages dont l'assemblage s'effectue dans des compartiments intracellulaires (Jouvenet et al., 2006; Jouvenet et al., 2011). Dans le premier cas, les complexes ARNg-Gag s'accumulent au niveau des microdomaines de type lipidiques appelés « lipid rafts ». Ces domaines sont riches en cholestérol, glycosphingolipides et d'autres lipides saturés. La déplétion de la production cellulaire en cholestérol inhibe la production des particules virales en prévenant l'interaction de Gag à la MP ainsi que sa multimérisation (Ono and Freed, 2001). La MA et plus spécifiquement sa région hautement basique ainsi que le résidu myristate situé à l'extrémité N-terminale sont essentiels pour l'ancrage de Gag aux microdomaines. En effet, l'interaction de la région basique avec PI(4,5)P2 de la MP induit l'exposition du myristate et son ancrage dans la MP, ce qui permet d'exposer CA-SP1 nécessaire pour l'assemblage des particules virales (Saad et al., 2006). De plus, la substitution du myristate par un

analogue non saturé inhibe l'association de Gag aux microdomaines. D'autre part, NC joue un rôle important dans ce phénomène. En effet, vu que le diamètre d'une particule du VIH-1 varie entre 100 et 150nm et la taille d'un microdomaine varie entre 5 et 50nm, il est impossible qu'une particule virale s'assemble et bourgeonne à partir d'un seul microdomaine. D'où le rôle de NC qui réside en l'augmentation de la densité des microdomaines avec lesquelles Gag interagit (Lindwasser and Resh, 2001).

D'autres domaines de la MP sont impliqués dans l'assemblage du VIH-1. En effet, une colocalisation a été démontrée entre des oligomères Gag en cours d'assemblage et des microdomaines TEM ou bien endosome-like domain (ELD). Ces domaines sont définis comme sites d'assemblage viral (Booth et al., 2006; Nydegger et al., 2006).

Plusieurs études ont montré la contribution du cytosquelette dans le transport de Gag vers les sites d'assemblage. En effet, les kinésines et les dynéines, en fixant Gag, sont impliquées dans son transport intracellulaire (Lehmann et al., 2009; Martinez et al., 2008). Concernant le rôle de l'actine, aucun consensus n'est trouvé actuellement. Certaines études montrent son implication dans l'assemblage et le bourgeonnement viral (Sasaki et al., 2004) alors que d'autres montrent que sa polymérisation n'est pas indispensable au transport de Gag et à l'assemblage viral (Rahman et al., 2014). Le transport de Gag est facilité par d'autres facteurs cellulaires tels que le complexe des protéines adaptatrices hétérotétramériques (AP) qui sont associées à la clathrine, les protéines du facteur de ribosylation de l'ADP ainsi que la protéine ABCE1 qui est impliquée dans la multimérisation de Gag grâce à son interaction avec le domaine NC de Gag (Balasubramaniam and Freed, 2011).

La MP n'est pas le seul site d'assemblage. Dans certains types cellulaires l'assemblage et le bourgeonnement sont réalisés au niveau des compartiments intracellulaires enrichis en marqueurs des endosomes tardifs ou MVB (Multivesicular Bodies). Le relargage des virions se fait alors par la voie cellulaire de libération des exosomes (Nydegger et al., 2003; Ono and Freed, 2004). C'est notamment le cas des macrophages où l'assemblage s'effectue majoritairement dans ces compartiments intracellulaires (Pelchen-Matthews et al., 2003; Raposo et al., 2002).

A ce jour le nombre de Gag formant un virion immature reste imprécis et sujet à controverse. Il semblerait que le nombre très élevé (>5000) rapporté par (Briggs et al., 2004) soit surestimé. Une étude plus récente par la fluorimétrie montre que les VLPs produits par des cellules HEK 293 sont constitués de ~2600 monomères Gag pour une expression génomique stable et ~3700 monomères pour une expression transitoire correspondant à un diamètre de ~ 116 nm et 143 nm, respectivement (Lavado-Garcia et al., 2021). Grâce aux techniques de microscopie de fluorescence, notamment au TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), la durée de l'assemblage a été déterminée par le suivi, en temps réel, de l'augmentation de fluorescence générée par l'accumulation de molécules Gag-GFP au niveau de la MP. Elle a été attribuée à ~8 min (Chamontin et al., 2015; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2008). Une autre étude en TIRFM montre que la polymérisation de Gag dure plus longtemps (26 min) en raison de pauses induites par des défauts d'interactions entre Gag-Gag ou entre Gag et des facteurs cellulaires tels que le complexe ESCRT impliqué dans l'assemblage viral (Ku et al., 2013).

- Bourgeonnement et relargage des particules virales

L'auto-assemblage des domaines CA de Gag en hexamères crée une énergie qui induit la formation d'une courbature de la MP initiant le bourgeonnement viral (Hurley et al., 2010). La courbature s'achève en 20 sec et donne naissance à des particules virales qui disparaissent des sites de bourgeonnement 0,5-3 min suivant l'initiation de la formation de la courbure. Il a été démontré que certaines particules virales restent attachées à la surface cellulaire pour plus de 30min avant leur relargage (Bednarska et al., 2020).

Les particules virales néoformées sont ensuite relarguées dans le milieu extracellulaire par fission membranaire. Celle-ci est catalysée par le complexe cellulaire ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui est constitué de trois complexes protéiques ESCRT I-II- et III. Ces complexes sont recrutés pour la biogenèse des MVB ainsi que pour le bourgeonnement et le relargage des virus HIV-1 par leur interaction directe avec les protéines Hrs et Gag, respectivement (Hurley et al., 2010; Jouvenet, 2012). Le recrutement des différents

complexes ESCRT s'effectue dans un ordre spatio-temporel bien précis. La première protéine à être recrutée est Tsg101 du complexe ESCRT-I. Le recrutement de Tsg101 s'effectue simultanément avec celui de Gag au niveau des sites d'assemblage. Cette protéine interagit avec le motif PTAP du domaine p6 (VerPlank et al., 2001) et le second ZF (ZF2) du domaine NC de Gag (Chamontin et al., 2015). Il est à noter que p6 et la NC peuvent également recruter la protéine Alix et dans ce cas le bourgeonnement ne passe pas par le complexe ESCRT I. La protéine Alix interagit par son domaine V avec le motif LYPX_nL de p6 et par son domaine Bro1 avec la NC (pour revue : (Jouvenet, 2012)) (**Figure 18**).

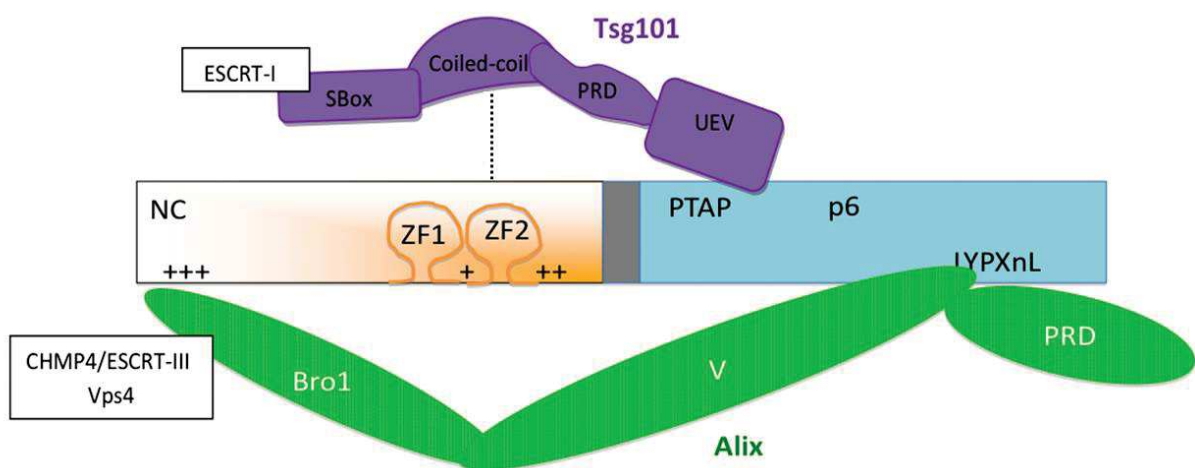


Figure 18: Interactions des domaines NC et p6 de Gag avec Alix et Tsg101

Tsg101 connecte Gag au complexe ESCRT-I par son interaction avec le motif PTAP de p6 et ZF2 de la NC. La protéine Alix fixe le motif LYPX_nL de p6 par son domaine V connectant Gag au complexe ESCRT-III. Son domaine Bro1 est reconnu par les résidus basiques au niveau de l'extrémité N-terminale de la NC induisant l'interaction de Gag avec Vps4.

Une fois l'assemblage accompli, la protéine Vps4 du complexe ESCRT-III entre en jeu pour réaliser la fission au niveau du cou du bourgeon. Vps4A qui agit comme une ATPase utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour ensuite recycler les facteurs ESCRT (Bleck et al., 2014; Hurley and Cada, 2018; Ku et al., 2014; Usami et al., 2009). Le relargage des particules virales est ensuite favorisé par la protéine virale Vpu qui prévient leur internalisation de la MP et leur endocytose dans des endosomes (Neil et al., 2006).

- Maturation des particules virales

L'infectivité des particules virales nécessite leur maturation durant laquelle les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont clivées par la PR pour libérer les protéines matures (**Figure 19**). La maturation s'effectue d'une façon concomitante aux étapes tardives du cycle viral et plus spécifiquement au bourgeonnement (Mattei et al., 2014). PR clive cinq sites dans chacune des polyprotéines Gag et Gag-Pol. Gag est clivée entre Sp1 et NC libérant les fragments MA-CA-Sp1 (p41) et NC-Sp2-p6 (p15). Ensuite, p41 est clivée entre MA et CA pour libérer MA (p17) et le fragment CA-Sp1 (p25) qui sera clivé en CA (p24) et Sp1. D'autre part, p15 est clivée entre Sp2 et p6 puis entre NC (p7) et Sp2. Ces clivages impliquent une série de changements conformationnels et des réarrangements des sous-unités pour former des particules virales matures. Une des caractéristiques de la maturation est la forme conique de la capsid qui renferme le dimère d'ARNg condensé avec les protéines NC. Cette étape signe la fin du cycle viral et permet aux virus néoformés d'infecter d'autres cellules cibles (Bell and Lever, 2013; Sundquist and Krausslich, 2012).

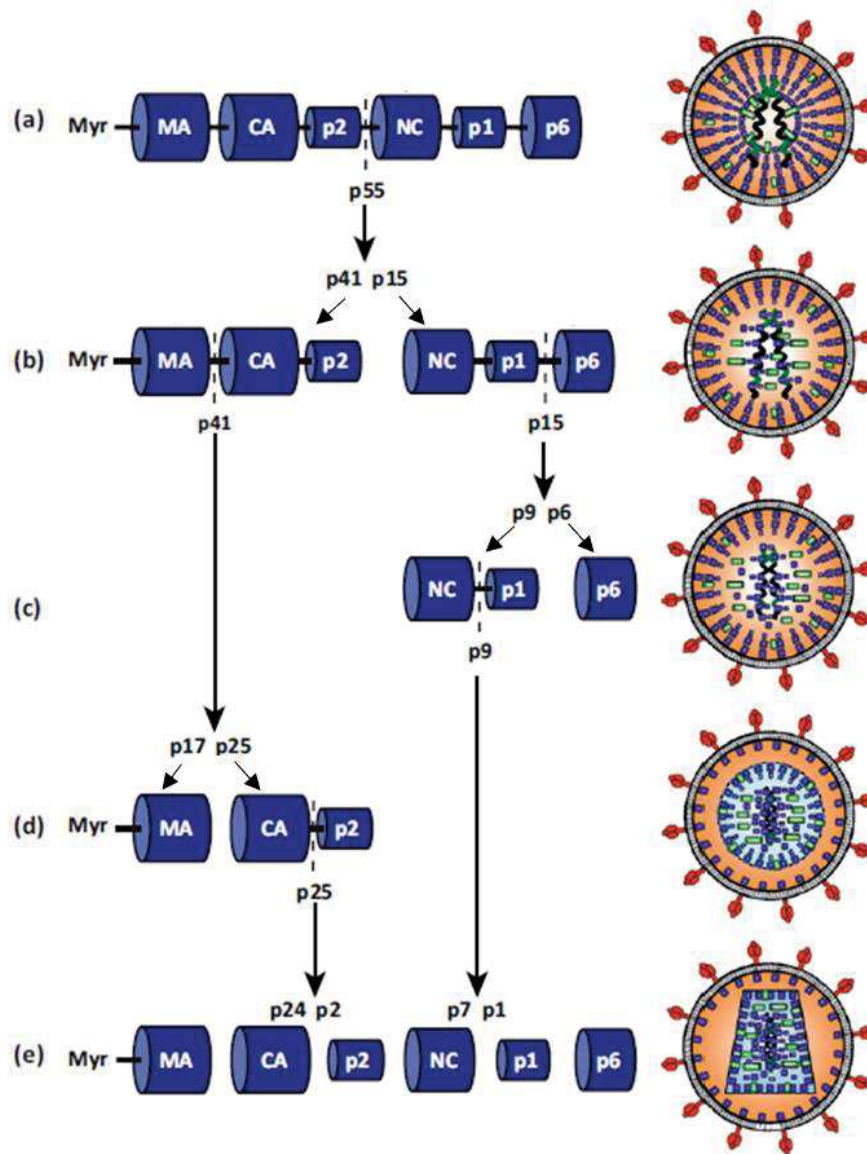


Figure 19: Etapes du clivage de la polyprotéine Pr55^{Gag}

Le clivage séquentiel de la polyprotéine Pr55^{Gag} est effectué par la protéase virale. Il donne naissance aux différentes protéines fonctionnelles de Gag (MA, CA, Sp1, NC, Sp2 et p6) (a-e). Ceci est accompagné du clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol} (non-représenté) et des réarrangements au sein de la particule virale pour donner naissance à une particule mature possédant une capside conique caractéristique (à droite) (D'après (Bell and Lever, 2013)).

Partie 2 : La Microfluidique

La microfluidique est classifiée en deux grandes catégories: La Microfluidique continue et la Microfluidique digitale. Dans cette partie, je présenterai la Microfluidique continue qui a été appliquée durant ma thèse.

1. Introduction à la Microfluidique continue

1.1. Définition

George Whitesides définit la microfluidique comme « La science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres » (Whitesides, 2006). Cette définition fait apparaître la dualité de la microfluidique : en tant que science, elle englobe l'étude des phénomènes et la mécanique des fluides à l'échelle micrométrique ; en tant que technique, elle contient également une dimension applicative.

Le flux du fluide est généré par l'application d'une différence de pression qui peut être créée par différentes méthodes : soit par l'utilisation des micropompes mécaniques ou bien par des mécanismes électrocinétiques (Su et al., 2006). Les concepts physiques qui dominent dans ces systèmes micrométriques diffèrent de ceux présents à l'échelle macrométriques. Ils seront détaillés dans la section 2 de ce chapitre. Les premières technologies miniaturisées qui ont été développées pendant le XXème siècle ont aidé au développement de la Microfluidique : il s'agit des systèmes MEMS (Micro-ElectroMechanical Systems) ou μ TAS (Total Analysis Systems). Leur développement avait comme but principal de rationaliser les protocoles complexes de dosage tout en réduisant le volume de l'échantillon utilisé et augmentant le débit (Sackmann et al., 2014). La fin du XXème siècle a signé l'essor de la Microfluidique. Celle-ci s'est impliquée dans plusieurs domaines et a été utilisée dans la chimie analytique (Ohno et al., 2008), l'étude des propriétés hydrodynamiques dans la mécanique des fluides (Joseph et al., 2006) et l'étude de la cristallisation des sels dans des microcanaux (Naillon et al., 2017). De plus, grâce aux différents avantages qu'elle offre, elle est largement appliquée dans le domaine de la biologie.

En effet, l'adaptabilité et la personnalisation des systèmes microfluidiques ainsi que le control précis des divers paramètres et la rapidité des réactions étudiées ont permis l'émergence de cette technologie qui rentre actuellement dans la recherche fondamentale aussi bien que dans la clinique (Convery and Gadegaard, 2019).

Les systèmes microfluidiques varient par leur conception et par les dimensions des microcanaux qui dépendent de l'application de chacun. Cette dernière exige une certaine méthode de microfabrication ainsi que le choix du matériel à utiliser.

Il existe plusieurs types de puces employées dans la microfluidique continue. On distingue les puces à base de polydiméthylsiloxane (PDMS), de verre et de silicium-verre. Les puces à base de PDMS présentent plusieurs avantages et sont plus utilisées que les autres types de puces. Du point de vue microfabrication, la fabrication des puces à PDMS est plus simple et moins coûteuse que celle des puces en silicium verre, par exemple. Due à sa faible énergie de surface, le PDMS se détache facilement du moule ce qui le rend un matériel favorisé surtout lorsqu'il s'agit des petites dimensions qui nécessitent une manipulation minutieuse. En plus, le PDMS est capable de se lier à lui-même et à d'autres matériaux par une simple exposition au plasma oxygène, d'où la possibilité de le sceller facilement soit à un autre bout de PDMS pour former des puces multicouches soit à des lamelles microscopiques (Convery and Gadegaard, 2019). Dans ce contexte, le PDMS présente une faible autofluorescence ce qui favorise son utilisation pour des applications mettant en jeu la microscopie à fluorescence (**Figure 20**).

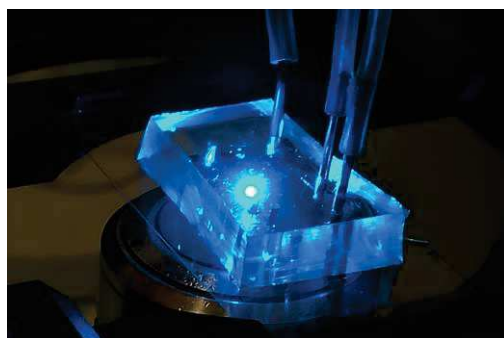
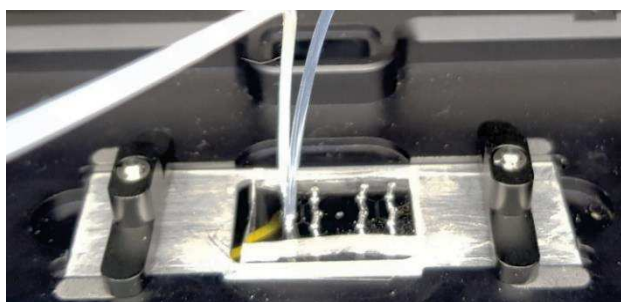


Figure 20: Illustration des puces à base de PDMS

Les puces de PDMS sont scellées à des lamelles en verre. Les solutions de perfusion sont connectées aux puits (trous transversales dans le PDMS) par l'intermédiaire de tubes en PTFE (Polytétrafluoréthylène). La couleur bleue de la figure à droite représente l'excitation du laser $\lambda=470$ nm pendant une observation en microscopie de fluorescence.

Du point de vue application, le PDMS est utilisé pour des applications biomédicales grâce à sa transparence, sa biocompatibilité et sa faible toxicité. De plus, sa perméabilité aux gaz le rend le matériel le plus favorisé pour des applications de cultures cellulaires qui nécessitent un contrôle précis des gaz mimant l'environnement physiologique. C'est un matériel à l'intérieur duquel il est possible d'insérer des valves pour assurer une bonne isolation et un contrôle efficace du fluide dans les différents compartiments de la puce microfluidique. En outre, en raison de son élasticité des membranes poreuses à base de PDMS sont largement utilisées dans les organes sur puce (Organ-on-a-chip) dans le but de séparer les différentes interfaces d'un organe, et donc de mimer son anatomie (Ren et al., 2014). En revanche, son élasticité peut présenter une limitation vue qu'elle peut induire des modifications au niveau de la structure et des dimensions des microcanaux. En outre, sa nature hydrophobique induit l'adsorption et l'absorption des molécules hydrophobiques et leur entrée à l'intérieur des microcanaux (Hou et al., 2017). Par contre, malgré ces défis, le PDMS reste le matériel le plus répandu et le plus utilisé surtout pour des applications manipulant des cellules.

1.2. L'application de la Microfluidique continue pour l'étude du VIH-1

La Microfluidique continue a bien intégré le domaine de la virologie. Dans le contexte du VIH-1, un large spectre de systèmes microfluidiques a été développé et manipulé au service de l'étude du virus tant au niveau fondamental qu'au niveau clinique. Les systèmes conçus permettent un diagnostic viral rapide et moins coûteux aussi bien qu'une étude approfondie des différentes étapes du cycle viral. La Microfluidique continue fournit des informations qui sont inaccessibles, dans certains cas, par l'utilisation seule des approches conventionnelles comme la microscopie et la culture 2D.

Ces différents systèmes sont présentés dans une revue dont j'ai eu l'opportunité de rédiger et qui fut l'objet d'une publication dans le journal *Viruses*.

Review

Advances in continuous microfluidics-based technologies for the study of HIV infection

Joëlle Eid¹, Marylène Mougél^{1*} and Marius Socol^{1*}¹ Institute of Research in Infectious Diseases, CNRS UMR9004, University of Montpellier, Team R2D2; Montpellier, France

* Correspondence: marylene.mougel@irim.cnrs.fr (M.M); marius.socol@irim.cnrs.fr (M.S)

Abstract: HIV-1 is the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It affects millions of people worldwide and the pandemic persists despite the implementation of highly active antiretroviral therapy. A wide spectrum of techniques has been implemented in order to diagnose and monitor AIDS progression over the years. Besides the conventional approaches, Microfluidics has provided useful methods for monitoring HIV-1 infection. In this review, we introduce continuous Microfluidics as well as the fabrication and handling of microfluidic chips. We provide review of the different applications of continuous Microfluidics in AIDS diagnosis and progression and in the basic study of HIV-1 life cycle.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Keywords: Microfluidics; HIV; infection; diagnosis; life-cycle; replication; retrovirus

1. Continuous Microfluidics

Microfluidics is the science of manipulating and controlling fluids, usually in the range of microliters. Two types of Microfluidics can be distinguished: continuous Microfluidics with the use of channels of tens to hundreds of μm of size, and digital microfluidics that relies on droplets manipulation [1]. Here, we focus on continuous Microfluidics which has been less described than the well-known droplets techniques [2, 3]. Due to rapidity, low volumes, precise control, multiplexing and automation, continuous Microfluidics is attractive in a vast spectrum of researches [4–7]. Microfluidics encompasses Micro-Total Analysis System known as $\mu\text{-TAS}$ or "Lab-on-a-Chip" that consists of the integration of multiple functions in a single microfluidic chip. For the choice of material and method in microfluidics applications, it should take into account that the physical concepts depend on scale [8]. For instance at the microscale when two fluids from separate reservoirs enter simultaneously in a microchannel, they flow parallel to each other without any stirring or mixing [9]. The success of the continuous Microfluidics relies on its accessibility, customization and low cost allowing biologists to design and adapt their own devices to their projects.

The standard fabrication is the molding method, which encompasses three techniques: replica molding, injection molding and hot embossing (for review see [10]). The replica molding, also known as soft lithography relies on photoactive materials and a polydimethylsiloxane (PDMS) polymer sealed onto either a glass slide, to form a monolayer device, or another PDMS layer to form a multilayer-based system [11] (Figure 1). Additional properties and functions can be added to the devices by integrating membranes, nanowells or nanopores into the PDMS-based chip for various applications [12–14]. The PDMS is transparent, biocompatible, gas-permeable and elastic. These properties explain why the molding method has been integrated into many biomedical researches [10].

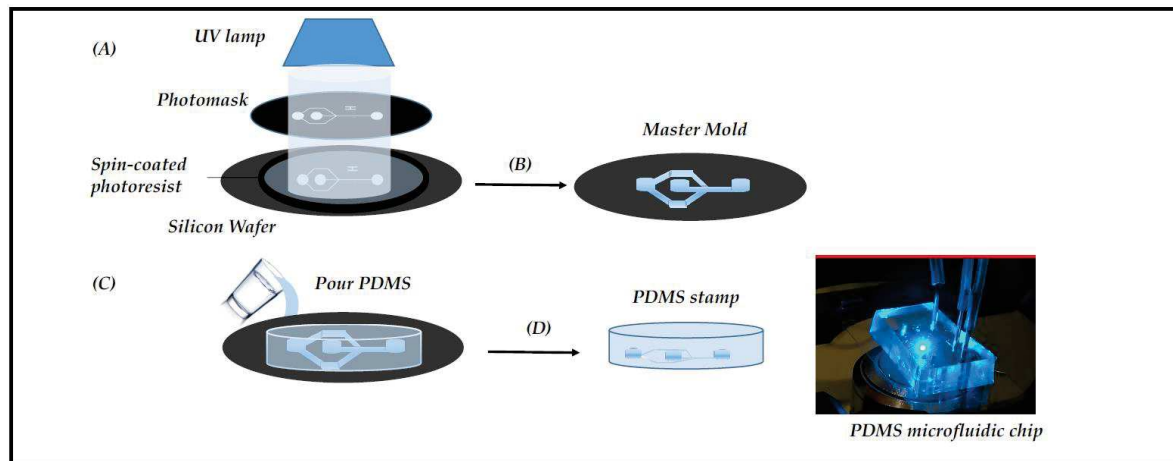


Figure 1. Microfabrication of the chips by photolithography. The main steps of photolithography are: (A) Negative SU8 photoresist exposure to UV radiation in order to obtain the pattern drawn on the photomask; (B) Photoresist development to obtain the master mold; (C) Pouring the PDMS on the master mold; (D) Curing and peeling off the PDMS stamp; finally, making holes in PDMS for external tubing and binding to a glass slide for microscopy (right picture).

Two other well-known fabrication techniques are the laminate method and the 3D printing. The laminate method is defined as the process of manufacturing thermoplastics or optically clear plastics, in multiple layers. The simplicity and rapidity of fabrication make lamination a powerful technique in biological research. Among all of the different techniques of 3D printing, stereolithography is a classic rapid prototyping technique [10]. It is used to create fine features that work through an optical process built layer on layer. This technology allows the integration of human tissue into a miniaturized device in order to mimic its microenvironment [15].

Besides the traditional microfluidic devices that are fabricated using PDMS or other polymers and plastics, microfluidic devices can also be fashioned from paper. Paper-based devices are especially used in developing countries due to their availability and low cost since no pump is required for fluid transport (passive transport) [16]. The microfluidic paper-based analytical devices (also called μ PADs) are fabricated by patterning many sheets of paper into hydrophilic channels bounded by hydrophobic barriers. Various techniques are available that are summarized in this detailed review [17].

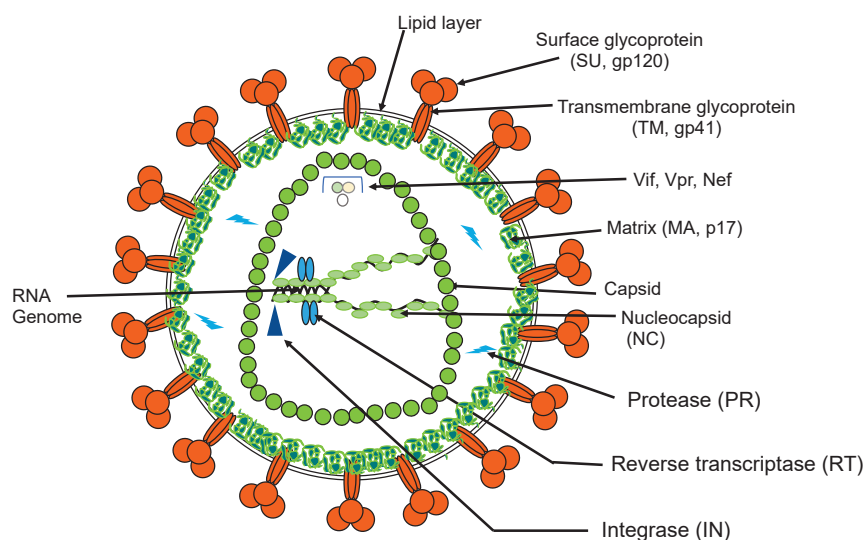
In this review we will describe and discuss the different strategies and devices used in HIV studies in order to facilitate the crucial choice of the most suitable and performant approach according to one's need (Table 1).

Table 1. Summary of the different microfluidic devices developed in HIV infection studies.

Applications			Device / Microfabrication	References
Clinical studies from patient samples	Diagnostics	Detection of HIV markers / antibodies	Microchannels / paper-based	32–36
		Co-detection of HIV-1 with HIV-2 or HCV	Microchannels / paper-based	39–41–44
		Quantification of viral nucleic acids	Microwells, Microchambers, Microchannels	45–48
		Multiplex detection of bacteria / fungus	Microchambers + lateral flow strip, Microchannels	49–51
		HIV isolation and imaging	Microchannels	52–54
	AIDS progression	Isolation and counting of T lymphocytes	Microchip + electrodes, Microchambers, Microchannels	56–57, 60–64, 66
		T lymphocytes quantification by DNA content	Microchambers + sinusoidal microchannels	65
		Detection of secreted cytokines	Microarrays enclosed inside a reversibly-bound chip	69
Basic research	CD4/CD8 ratio measurement		Microchannels (with valves and electronic setup)	70–71
	Membrane fusion	gp41 binding capacity to cellular membrane	Quartz Crystal Microbalance (QCM) chip	73
	Cytoplasmic interactions between HIV and host proteins	Interaction between HIV capsid and host factors (CPSF6 and cyclophilin A)	Microchannels	75–76
	Reverse transcription	Mutation of the reverse transcriptase	Microchannels	77
	HIV gene expression	Kinetics of gene expression	Microchannels	78
		HIV latency	Microchannels	79
		Sp1-DNA dissociation	Microchannels	80
		Tat-TAR interaction	Microchannels (capillary mobility shift assay)	81
	HIV release	Virions quantification	Microchannels, Microchambers	82–84
		Virions trapping	Microchambers	83, 85–87

2. Microfluidics for studying HIV infection

HIV-1 induces AIDS and affects several millions of people worldwide. The pandemic persists despite the implementation of highly active antiretroviral therapies [18, 19] which must be taken lifelong (for review: [20]). The major causes of HIV-1 resistance to antivirals are due to the high mutation rate of the virus [21] as well as the viral latency with the persistence of silent-HIV reservoirs in infected cells [22]. HIV belongs to the *Retroviridae* family. Its genome is composed of a dimer of two identical RNA molecules packaged in an enveloped capsid (**Figure 2**).

**Figure 2.** Simplified schematic representation of HIV-1 particle.

HIV enters the cells of human immune system (especially CD4⁺ T cells) via the attachment and the fusion of its envelope glycoproteins (Env) with the target cell's membrane, initiating the infectious cycle. HIV replication cycle lasts approximately 24 h [23, 24]. During viral capsid disassembly, the genomic RNA (gRNA) is converted into double-stranded DNA by the viral reverse transcriptase (RT) in a finely regulated timeline (for review: [25]). Interestingly, recent works have reported a nuclear localization of the reverse transcription and the uncoating steps. These data fundamentally change our current spatio-temporal vision of these postentry events [26, 27]. Stable integration of this viral DNA into host cell chromosomes by the viral integrase (IN) is an essential step in the life cycle that allows persistence of viral genomes for the lifespan of infected cells. Viral transcription relies on cellular machinery, which is *trans*-activated by the viral Tat protein. The primary transcript plays two roles. It ensures viral protein synthesis. HIV-1 uses several non-canonical pathways to translate its own proteins, such as leaky scanning, frameshifting, shunt, and cap-independent mechanisms (for review [28]). Moreover, the viral transcript serves as viral genome for progeny virions. It forms RNA dimer in the cytoplasm with the help of the viral Gag protein [29], and the Gag-RNA complex targets the plasma membrane to form new viral particles (for review: [30]). The replication cycle ends with the release of new viral particles, which proceed to the last maturation step to be infectious.

2.1. Microfluidic tools for diagnostics

Usually HIV tests are based on the detection of viral antigens or anti-HIV antibodies in blood by using immunoassays (ELISA, Western blot). HIV can also be sought via its nucleic acids by PCR amplification techniques [31]. A wide range of microfluidic-based systems are currently available that insure a rapid, sensitive and low-cost diagnosis of HIV infection.

An automated microfluidic system, namely μ Western blot was developed for the detection of several HIV markers (RT, gp120, p24) and antibodies (anti-gp120/p24). The system unites protein sizing and antibody probing in one system, and allows to simultaneously run 48 μ Westerns as well as the analysis of 3 protein targets per blot. Compared to conventional Western blot, the μ system provides high precision with a low limit of detection (LOD) of 50 pM, a reaction time of 60 min and 10^3 -fold reduction in reagent consumption [32]. Similarly, several microfluidic devices have been implemented to improve standard ELISAs used for the detection of p24 protein fluorescence and anti-p24 antibodies from plasma [33, 34]. A microtiter technique called europium nanoparticles-based immunoassay, is miniaturized to a microchip platform. Due to their high photostability and resistance to self-quenching, the europium nanoparticles ensure a stable and high-intensity fluorescence emission, increasing the sensitivity of the system up to attomole levels [33]. Interestingly, a hierarchical nanofluidic molecular enrichment system (namely HOLMES) was developed (Figure 3). Based on electro-osmosis phenomena, it ensures an increase in the biomolecules concentration throughput and speed in ion depletion zones, achieving billion-fold enrichment of biomolecules within 30 min into a single microchannel [34].

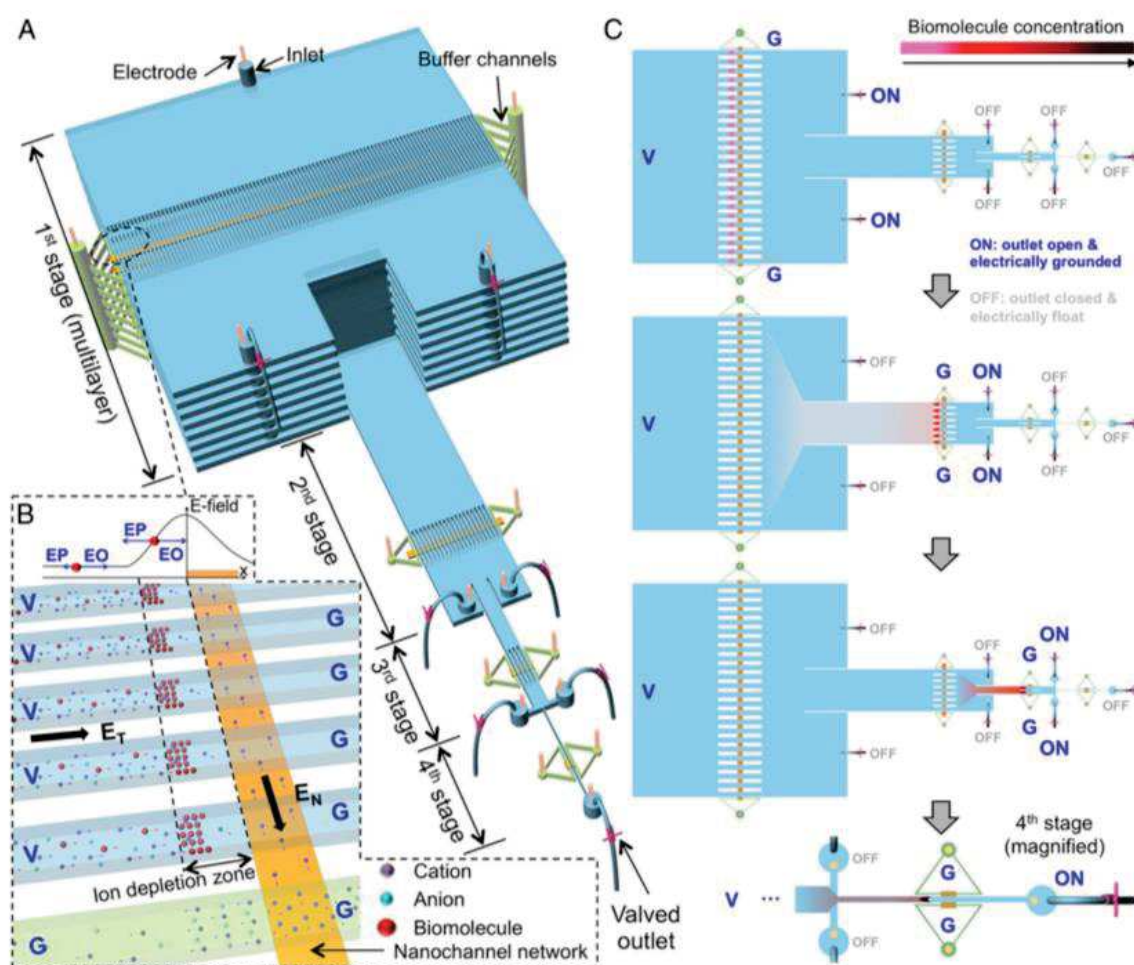


Figure 3. Principle of HOLMES [34]. (A) Schematic of HOLMES with hierarchical multistages. At each stage, parallel microchannels and buffer channels are bridged by a thin nanochannel network apatterned on the bottom of the microchannels. (B) Schematic of nanofluidic biomolecule concentration in massively parallel channels. Under the electrical configuration shown, biomolecules are electroosmotically injected into the parallel channels and electronically concentrated in the ion deletion zones induced near the micronanochannel junctions. V: voltage; G: grounded; EN and ET: normal and tangential electric fields, respectively; EO: electroosmosis; EP: electrophoresis. (C) Schematic of relayed reconcentration of biomolecules from massively parallel microchannels into a single microchannel to dramatically boost the concentration performance.

There is also another method for the detection of the anti-gp41 marker in blood, which can distinguish different HIV subtypes. This portable and cost-effective immunoassay uses silver reduction. It is performed in a PDMS microchannels network, integrating the immunoassay and the optical detection. The reduction of silver ions results in a silver film whose opacity is a function of the concentration of the gp41. The system has no photo-bleaching and the signal is stable for months [35]. Microfluidic immunoassay can also be integrated in paper-based microdevices. A system combining paper-based microdevices and electrochemical impedance spectroscopy detection has shown high sensitivity in p24 detection. It relies on paper-based origami nanobiosensors assembled into two pieces of cellulose paper. This label-free and ultrasensitive detection of p24 antigen has a LOD of 300 fg/ml, which is 33 times lower than that of a commercial p24 ELISA kit (10–15 pg/ml). Also, no interference in p24 detection was observed when other virus-associated antigens were present in serum samples [36].

Advances in microfluidic HIV diagnosis systems have encouraged the researchers to develop multiplexing devices that allow the detection of co-infections. Multiplexing brings rapidity, high

sensitivity and precision especially with a minimal cross-reactivity. Since hepatitis B and C viruses (HBV, HCV) have a high prevalence in HIV-infected patients and are suspected of HIV-1 co-infection [37, 38], it is of great interest to diagnose simultaneously these viruses. Several microfluidic devices have been developed for multiplexed detection which differ by the detection system used [39, 40]. One integrates Quantum dots (semiconductor nanoparticles Qdots) into PDMS microchannels fabricated by soft lithography containing sera samples. Qdots are coated with a hepatitis B surface antigen (HBsAg), HCV nonstructural protein 4 (NSP4), and HIV glycoprotein 41 (gp41). Electrokinetics is used to transport Qdots in the microchannels, and as a Qdot passes through a focused laser spot, a fluorescence is emitted and detected. The feasibility was demonstrated with the three diagnostic targets: HBV, HCV and HIV [40].

The paper-based microdevices have also demonstrated advantages for multiplexing with sensitivity and negligible cross-reactivity. The device contains eight electrochemical immunosensors to test multiple serum samples with the simultaneous detection of antibodies against HIV p24 antigen and HCV core antigen [41]. Although HIV-1/HIV-2 co-infection occurs at a low prevalence, it may cause different progression to AIDS than monoinfection and lead to anti-retroviral drug resistance [38, 42, 43]. To detect these two types, a microfluidic barcoded chip was designed that contains several sets of PDMS-based microchannels. HIV-1 anti-gp41/gp120 and HIV-2 anti-gp36 antibodies have been distinguished in six human sera and they appear as dark bars or light spaces depending on the positive or negative results [44].

A different diagnostic way relies on the detection and the quantification of viral nucleic acids by using quantitative PCR (qPCR). However, the loop-mediated amplification (LAMP) technique is advantageous over standard qPCR since the use of loop primers accelerates the reaction. It is also cheaper because it does not require expensive thermocyclers. LAMP technique can be integrated into different microfluidic devices such as the SlipChip that consists of two plates containing microwells: the top plate loaded with the sample and the bottom plate loaded with the reagents [45]. The performance of the microdevice was compared to that of qRT-LAMP. In the digital format molecules are separated into compartments and amplified, which requires only an end-point readout. The initial concentration is determined depending on the number of positive wells, the volume of each well and the total device volume. However, in a kinetic format, the analyte is amplified in a bulk culture and the amplification progress is monitored as a function of time. Then the original concentration is determined by comparing the reaction trace to standard curves from solutions of known concentrations. Unlike qRT-LAMP, the device showed high precision due to its ability to distinguish different concentrations of HIV-1 RNA with changes of 3 °C in temperature [45]. LAMP assay was tested, as well, in a biomolecular amplification reader coupled with a microfluidic cartridge containing 96 reaction chambers. The device showed rapidity in HIV integrase gene amplification detected using calcein metal indicator fluorophore [46]. Nucleic acid quantification is done, as well, with a conventional PCR integrated into microfluidic chips. PCR chips have been considered as a powerful tool for genetic analysis. Usually, the detection of the PCR product is performed by capillary electrophoresis (CE) and fluorescence analysis. However, cross-contamination concerns prevent their reuse. This challenge has been overcome by developing a reusable chip. The reusability of the PCR chambers is insured by stripping and re-silanizing of the glass surfaces. The system has been validated by the amplification of a 115 bp fragment from HIV gag region [47]. Note that microfluidic systems based on centrifugation assisted precipitation have also interesting features for nucleic acid detection. One relies on loading the mix of target DNA and GelRed intercalating dye into a microfluidic channel followed by the centrifugation of DNA-GelRed flakes to form a quantifiable precipitate. This approach does not require DNA purification and has been successful in HIV genome quantification with a LOD of 10 ng/μl [48].

Since opportunistic infections are more frequent or more severe for immunosuppressed HIV-infected persons (<https://aidsinfo.nih.gov/guidelines>) it is of great interest to develop multiplexed microsystems to analyze bacterial, fungus and viral nucleic acids from a single sample. The challenge consists of developing a microfluidic "lab-on-a-chip" that harbors several interrelated components, each

miniaturizing one step of the procedure from sample collection to PCR amplification of several pathogens together. For this purpose, a hydraulically driven chip was fabricated integrating several structures (chambers, membrane, lateral flow strip) into a cassette. After receiving the fluid sample and metering its volume, the multifunctional chip proceeds to a cascade of reactions that occur into different compartments: pathogens lysis, nucleic acids isolation, PCR and RT-PCR performance. The system showed ability to detect amplicons for both pathogens with a 3-fold more sensitivity than the conventional ethidium bromide-stained agarose gels [49]. A simple system with a different detection strategy was successfully able to detect four genetic targets for HIV, HBV and syphilis (*Treponema pallidum*) [50] (**Figure 4**). It is based on the injection of Qdot-barcoded beads into a microchannel fabricated by soft lithography and their handling by magnetic force. Despite the sensitivity of the device and the absence of a cross-reaction, it requires off-chip sample pretreatment (cell lysis and nucleic acid extraction) [50].

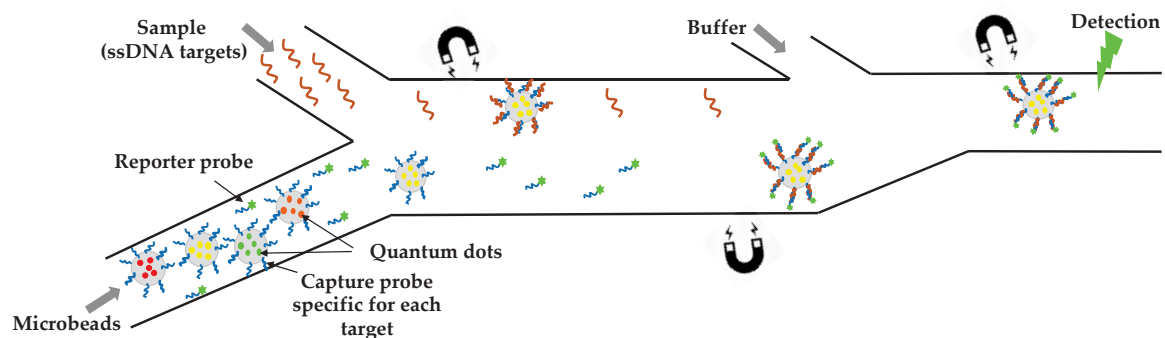


Figure 4. Overall design of the QD barcode assay. Electrokinetics is used to transport QD-barcoded microbeads ($\varnothing = 3.8 \mu\text{m}$) into a microchannel. The flow is going from left to right: **i**) magnetic barcodes are attracted by a first magnet to interact with the target ssDNA present in the upper stream, **ii**) then they move toward the second magnet to interact with the reporter probe present in the lower stream, and **iii**) they are pulled by the last magnet into a washing buffer and aligned for optical excitation and detection. They are individually detected by fluorescence as they pass through a focused laser spot. The figure shows the detection of one genetic target, but for multiplexed detection, the same process is done for the different ssDNA targets simultaneously [50].

Besides its implication and efficiency in the detection of HIV nucleic acid, LAMP technique can also be used for codetection of different pathogens. In this context, a multiple μLAMP was carried out in a microdevice with the shape of a five-pointed star containing five microchannels coated with specific DNA probes for detection of different pathogens. Five different PCR reactions can be done simultaneously. The patient sample and the different reagents are injected via the center hole and are spread evenly through each branch by capillary force. After reaction, the chip is sealed and immersed in a water-bath. Final results were determined by the appearance of green fluorescence induced by SYBR green intercalating dye. This simple and fast technique has been successfully used for the simultaneous detection of HIV-1, tuberculosis bacilli and *Pneumocystis jiravecii* known as *Pneumocystis carinii* in saliva [51].

Virus isolation and imaging is another strategy for HIV diagnostics. Whole blood sample of HIV-infected patient is injected in a microchannel coated with biotinylated anti-gp120 antibody. Viruses are recognized and captured by the antibody, and virus identification is realized by a dual staining which increases the sensitivity of the device. The system is then improved by designing three microchannels in parallel instead of one: one for sample testing, and two for positive and negative controls. In both cases, the system allowed not only a rapid capturing of HIV particles within 10 min but also a continuous and a long-term imaging of the viruses due to the Qdots that provide remarkable photostability and brightness. By immobilizing the Protein G on-chip, it is possible to capture HIV-1 subtypes A, B and C from culture supernatant or whole blood with viral loads in the range of 10^3 to 10^5

copies/ml [52–54]. These studies pave the way for a sensitive monitoring of viral load and could replace real-time PCR-based approaches.

2.2. Microfluidic tools for monitoring AIDS progression

Identification of the AIDS staging evolution of patients is crucial in the treatment decision. The progression of HIV infection can be monitored by the isolation and the enumeration of CD4⁺ T lymphocytes in blood samples, which are the primary target cells of HIV. Clinically, a CD4 count below 200 cells/ μ L establishes the diagnosis of AIDS, and in most settings is used to initiate antiretroviral treatment and prophylaxis against opportunistic infections [www.who.int/hiv/pub/guidelines/patientmonitoring.pdf]. The most employed technique to detect and to measure physical and chemical characteristics of a population of cells is the flow cytometry (FCM). This technique is routinely used in basic research, clinical practice and trials for cell sorting. FCM relies, among other physical properties, on hydrodynamic focusing in a flow chamber [55]. Another single-cell technique is impedance FCM. This new system is a label-free technology, which has recently been enhanced by "lab-on-a-chip" approach [56]. It consists of a chip equipped with microelectrodes that measure impedance changes of the medium when cells or other particles pass through the electric field. The absence of optical components reduces set-up times and maintenance to a minimum. However, the cytometers are voluminous and expensive. To circumvent these inconvenients, a label-free system was reported [57] (Figure 5). CD4⁺ T cells and monocytes are distinguished by their different responses to shear stress on the functionalized device surface. Indeed, with a shear stress of 0.2 Pa, the CD4⁺ T cells were preferentially captured while the monocytes adhere in minority. This is mainly because monocytes express about one order of magnitude of CD4⁺ less than the lymphocytes [58, 59]. In this study, the retained cells are counted with a simple light microscope. Sensitivity and specificity of these microchip assays for the clinical threshold of 200 cells/ μ L indicate R₂ higher than 0.86 when compared with FCM.

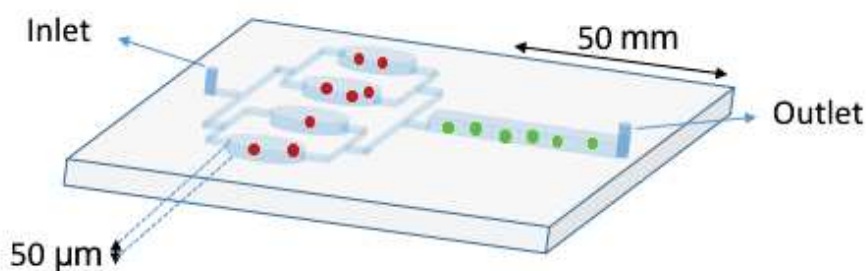


Figure 5. Double Stage Cascade Device used for CD4 counting. The PDMS device harbors 2 distinct functions: the monocyte depletion (upstream) and the CD4⁺ T cell capture (downstream). The upstream region contains four parallel chambers (50 μ m height) coated with an anti-CD14 antibody in order to specifically retain the monocytes (red spots). The monocyte depletion increases the sensitivity and specificity of CD4⁺ T cell (green spots) retention in the main channel (downstream) which was functionalized with an anti-CD4 antibody. After sample injection rinsing steps are crucial to avoid shearing off captured cells [57].

To overcome challenges like chip fabrication and rapid detection and counting of CD4⁺ T cells, a new integrated platform was developed [60]. The CD4⁺ T immobilization followed the protocol

previously described and the captured cells were detected using a charge coupled device (CCD) sensor by the lensless imaging platform: the white light, emitted by a halogen lamp passes through the polymethyl methacrylate cover, reaches the cells and then the light intensity of a cell shadow image is determined by diffraction. Further, an automatic cell counting software was developed to enumerate the captured cells in three seconds and overall process is carried out within 10 mn. The integrated platform achieved $83.5 \pm 2.4\%$ performance ($n = 9$ devices) compared to FCM. The great performance of this system has conducted to a portable version of the system which was successfully tested in the USA and Tanzania [61]. The system operates without antibody-based fluorescent labeling and expensive fluorescence microscopy. Qdots [62] or magnetic beads can be associated to cells immunocapturing (immunomagnetic isolation) assays in which cells are separated by centrifugomagnetophoresis [63]. This “lab-on-a-disc” contains the PDMS microfluidic channels and the co-rotating magnets. Whole blood is incubated with paramagnetic microparticles that specifically bind phenotypic markers on target cells. This multforce separation is continuous and its efficiency was up to 92% for cells expressing the HIV/AIDS relevant epitope (CD4) [63]. Meanwhile, it was implemented an immiscible filtration assisted by surface tension (IFAST) device for isolating CD4+ T lymphocytes from whole blood samples [64]. IFAST is a sample preparation method that utilizes water/oil microfluidic interfaces in a PDMS chip to permit rapid magnetic bead-based isolation of cells (Figure 6). The Dynal T4 Quant kit protocol (Invitrogen) that requires a laborious manual data collection process, was modified such that both the monocyte depletion and CD4 isolation occur in a pair of IFAST devices.

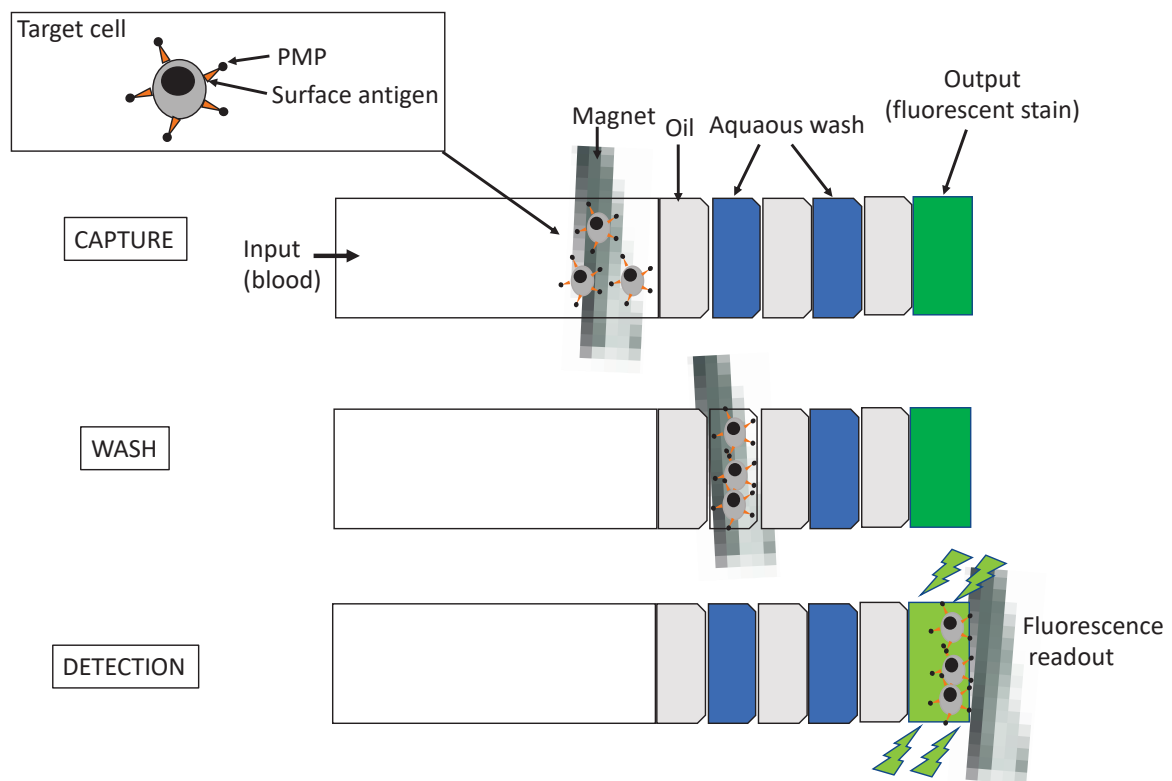


Figure 6. Schematic representation of the IFAST device. It is formed by 7 successive flow chambers containing three oil barriers. The magnet at the bottom of the device is moved from the input to the output wells at a rate of 1–2 mm per second. The paramagnetic particles (PMP) move with the magnet, carrying along attached cells and excluding unbound cells at the immiscible phase barrier. Isolated cells are dyed on-chip with a small molecule dye (Calcein AM) metabolized to a fluorophore to be read by a fluorometer [64].

It is also possible to quantify CD4⁺ T cells by measuring DNA content of isolated cells [65]. In this case, magnetic-based immunocapture and DNA-beads assay are integrated into two-stages PDMS chip. Different masses of silica-coated magnetic beads were added and aggregation between beads and DNA corresponds to the DNA quantity and therefore, the CD4 count. The device achieved an excellent correlation ($R^2=0.98$) with FCM.

Recently, a new technique of chip microfabrication based on Inkjet printing method has been adapted to CD4⁺ T cells trapping [66]. Furthermore, by the same technique, hydrogel layers with embedded fluorophore-labeled antibodies were deposited on polymethyl methacrylate slides onto microfluidic chips. The hydrogel layer maturation consists to control antibody release from printed layers for intense and homogeneous on-chip cell staining. After incubation, the chambers are imaged in a custom-built, wide field-of-view fluorescence imager, which also performs the automated image analysis, to count CD4⁺ T cells (number of cells per μL of blood). Again, this technique showed an excellent agreement with FCM ($R^2 = 0.97$; $N = 57$) [66].

To diagnose opportunistic viral or bacterial infections, the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T cells or the quantification of the cell-secreted cytokines (such as IL-2 and IFN- γ) are relevant parameters of immune response [67, 68]. To this end, printed microarrays of cell- and cytokine-specific antibodies spots were enclosed inside a PDMS reversibly-bound chip in order to capture T-cell subsets of red blood cells depleted whole blood. Mitogenic activation of T-cells followed by immunofluorescent staining of the microarrays revealed fluorescence signals due to binding of IL-2 and IFN- γ on anti-cytokine antibody spots. The cytokine signal was quantified with a microarray scanner after removing the PDMS from the glass slide. [69]. Another strategy for CD4/CD8 ratio measurement is based on creating two independent affinity regions in a single microfluidic channel. Two different monoclonal antibodies are coated separately onto different capture regions. Only 2 μL of lysed human blood samples were loaded to fill the entire channel capacity, followed by a stop flow incubation that selectively captured CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes on each corresponding region. The ratio measurement was achieved within 1h and it showed a close agreement with FCM ($R^2=0.97$) [70]. A more complex design incremented by a biosensor [71] also harbors a good score compared to FCM ($R^2=0.92$). The advantage of this biochip is that it can be adapted to enumerate other specific cell types.

2.3. Microfluidic applications in HIV-1 basic research

Microfluidics also provides advanced technologies to decipher the molecular mechanisms involved throughout the HIV life cycle, from virus entry, reverse transcription, gene expression to virus production, mainly at the single cell and single molecule levels.

Upon HIV binding to the host cell receptor and coreceptor, the viral envelop gp120 and the transmembrane gp41 glycoproteins play an essential role in the fusion between virus and cellular membranes leading to virus entry [72]. In this process, gp41 plays a critical role since the rate of fusion depends on its fusogenic activity and its expression level. The study of gp41 function may provide new clues in antiviral strategies since gp41 is a major target. A sensitive method to study gp41 binding capacities has been developed based on epitope-imprinting strategy. A quartz crystal microbalance measures the change in frequency of a quartz crystal resonator. In this study a synthetic peptide of gp41 was used as template for molecular imprinting and a microchip has been fabricated to bind gp41 epitope by a biomimetic sensor. The system is also able to recognize the whole gp41 proteins with high affinity and selectivity among other biomolecules ($K_d = 3.17 \text{ nM}$) [73].

After virus entry, the HIV capsid comes into play. The capsid is a multifunctional protein that coordinates nuclear import, reverse transcription, virus uncoating, and integration [74]. Thus, it interacts with crucial host factors that regulate infection. To study the role of the capsid during these early steps of infection, another type of biosensing strategy has been developed measuring dual-color fluorescence by total internal reflection fluorescence videomicroscopy. Binding events are observed in

real time on a sensor surface assembled on a glass coverslip located at the bottom of a PDMS chip device. In this study, the sensor surface is coated with antibodies for immobilization of fluorescent self-assembled capsids. The stability of the surface allows its reuse. Binding and dissociation with a fluorescent capsid-partner is detected by the appearance and disappearance of the fluorescent signal colocalized with capsid proteins. Thus, the system measures binding affinity, stoichiometry, and kinetics of host proteins known to interact with the HIV-1 capsid to promote infection. Several capsid partners are already well-known and the proof of concept of the system was realized with the cellular cyclophilin A and CPSF6 (phenylalanine-glycine motifs of cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6) proteins. The biosensor assays showed detection limits for weak interactors with $K_d = 1\text{--}100\ \mu\text{M}$ (such as CPSF6). This system could accelerate characterization of novel capsid binders [75, 76].

The crucial reverse transcription of the HIV genome was the first to be successfully targeted among antiviral strategies. However, the efficiency of anti-RT drug therapy is limited by the emergence of RT mutations that confer HIV resistance to anti-RT compounds. Compared to conventional methods such as gel electrophoresis and melting curve analysis, the use of Microfluidics provides compelling advantages in the detection of these mutations. As shown by an *in vitro* assay developed to discriminate the well-known synthetic K103N point mutation from wild-type template, the technique brings rapidity (30 min), small volumes (5 μL), specificity, and sensitivity in nanomolar range (100 nM) [77]. The assay includes ligation of specific fluorescent probes to target sequences, duplex denaturation, magnetic microfluidic separation and fluorogenic detection. The PDMS chip consists in a microchannel 30 mm long tapered to concentrate circulating reagents. A magnet is placed underneath the chip and only the target templates with the magnetic ligation products flow along the channel and will be collected in the outlet well to be detected by a fluorometer. In the future, the technique could be used to assess other mutations that would be responsible of virus resistance to antiviral drugs.

Microfluidic applications are also found in the study of further HIV expression steps. Analysis of intracellular HIV expression often requires cells capture and immobilization in order to probe dynamic processes at the single-cell level. Microfabricated PDMS devices offer an ingenious approach to long-term single-cell studies. Indeed, it is possible to measure single-cell gene-expression kinetics for up to 60 hours as demonstrated by Razooky et al [78]. They loaded resting primary CD4⁺ T lymphocytes into a round microwell with a diameter comparable with that of cells. Then, the cells progress into cell-imaging channels by gravity. The cells expressed GFP-HIV construct allowing tracking of HIV expression over time, since the device allows rapid and simple media exchange without displacement of cells [78]. The proposed devices enable experiments with any other cell types. A simple method to achieve cells capture is the insertion of physical traps embedded in the microchannel of PDMS chip connected with inlet and outlet reservoirs. In this case, no pump or tubing is used to aid fluid flow within the device. Suspension cells (Jurkat) are trapped as they passively flow from the inlet to the outlet. The experimental model used with this device consists in a stable clonal cell line integrating a latent GFP-HIV which requires transcription activation to turn green. To study HIV activation, the chip is fixed on a fluorescence microscopy stand and time-lap images are taken for up to 24h. Activation was stimulated by transcription factor activators or histone deacetylase inhibitors. Interestingly, they achieve latent HIV activation with different and uncorrelated rates and onset times. Thus, these results reveal the complexity of the reactivation mechanisms, moderating the effectiveness of the clinical "activate-and-kill" strategy [79].

Intracellular molecular mechanisms have been more closely investigated by using Microfluidics, as exemplified by this study of the cellular transcription factor, Sp1, which regulates HIV transcription [80]. To do so, a binding assay platform was constructed that implements fluorescence correlation spectroscopy (FCS) on a PDMS titration chip to measure the binding of Sp1 to HIV DNA promoter. The chip harbors a serpentine channel for mixing the reagents and after opening a valve, the mixture enters a nanoliter-sized analysis chamber. The chamber can be isolated by closing the valves to stop the flow in microchannel. Then, fluorescently-labelled free DNA and DNA bound to Sp1 are quantified by FCS

in a purely diffusion-governed environment. The system also enables titration experiment of an intercalative drug that dissociates Sp1-DNA interaction. FCS results confirm that Sp1 bound strongly to GGGAGG sequence and that the intercalative drug tested (doxorubicin) has a $IC_{50} = 0.55 \mu M$ [80], comparable to previously published value. Different microfluidic systems have been developed to study protein-nucleic acid interaction based on capillary mobility shift assays incorporated in a microfluidic chip. The authors choose the well-characterized system of the binding of HIV trans-activator of transcription (Tat) to the transactivation-responsive RNA (TAR). Tat/TAR interaction enhances elongation transcription, resulting in productive transcription of HIV full-length genome. Briefly, samples containing short peptides and oligoribonucleotides are injected into microchannels and are separated by pressure-driven flow and through the application of an electric potential difference. Molecules and/or complexes are subsequently visualized via LED-induced fluorescence. It is also possible to use full-length Tat protein instead of short peptides. Like the above system using FCS on a PDMS titration chip, this setup is applicable to examining drug impact on the interaction in a dose-dependent manner. Here the authors calculated an IC_{50} for the neomycin inhibitor = $1.6 - 3 \mu M$ [81]. Compared to FCS-based microfluidic, this method presents the advantage to perform assays in high-throughput screening-compatible formats. These two microfluidic-based methods are versatile tools to study any types of molecular bindings.

The last step of HIV life cycle corresponds to the release of the virus progeny into the extracellular medium. Rapid quantification of viral particles in solution by flow virometry has been an elusive goal for virologists. Microfluidics provides several answers to this long-last need. Most methods use fluorescently-labelled HIV (GFP-HIV) or HIV bound on fluorescent beads to distinguish viral particles from extracellular exosomes since both two nanoparticles share similar range of sizes. First of all, it is important to know that similar virus production kinetics are obtained when culturing cells in PDMS microdevices under continuous flow or in standard tissue culture in plate. Also, viral titers are independent of the shear stress that cells undergo in the chip [82]. The main challenge for flow virometry systems is the specificity and the sensitivity of the signals, which must correspond to individual virus detection in culture medium or physiological samples ($< 100 \mu l$). Optical tweezers, which use the momentum of photons to trap viruses, achieve promising results [83]. HIV GFP-virions are delivered into a microfluidic chamber at the concentration of $0.4-4.0 \times 10^8$ virions/ml. They are immediately detected by infrared laser due to the two-photon excitation of GFP by the trapping laser. This optical trapping virometry has single-molecule resolution and can also discriminate between individual and viral aggregate since they produced different laser deflection signals [83]. A commercial apparatus is now available for nanoparticle tracking analysis that allows virions quantification with a LOD: 1.7×10^7 particles/ml [84]. However, better LOD can be reached by complexifying the microdevices while keeping the sample processing as a simple flow-through process. For instance, enhancement of viral detection is obtained by the fabrication of porous devices with nanopore array over flatbed microchannels [85]. The system was tested with biotinylated HIV virions captured in channels with surface functionalized with Avidin (NeutrAvidin). High HIV capture yields (80%) are reached for a large range of HIV concentrations (10^3-10^6 virions/ml [85]). A clever biosensing system has also been proposed that consists in electrical sensing viruses through capacitance spectroscopy on a flexible plastic chip with printed electrodes. The advantage of this system is its low LOD with reliable measurement of 10^2 virions/ml. But the method requires several off-chip steps including: capture of virions by magnetic beads conjugated with biotinylated anti-gp120 antibodies, extended washing to remove residual electrically conductive background, and lysis of captured virions by Triton x-100 before injection into the chip for virions measurement [86, 87]. Therefore, this system cannot be used for dynamic studies. Actually, to date there is no relevant techniques for kinetics study of the viral production. This is mainly due to the LOD limitation of the current techniques. Implementation of new microfluidic strategies to study the virus release in real-time from a single-cell will constitute the next challenge in the field of retrovirology.

3. Conclusion

Microfluidics has revolutionized the fields of Biology and Health by offering the possibility of managing biological samples in tiny channels and chambers. The microfluidic technology is a powerful tool with many advantages such as: rapidity, reliability, specificity, multiplexing and inexpensiveness. It also allows the studies at the single-cell scale and the development of high-throughput approaches.

Microfluidics has recently entered the field of HIV-1. The review tackles the continuous microfluidics and their different implications in the study of HIV infection. These information are summarized in Table 1 in order to help the investigator to choose the most appropriate technique to use. Although the review has been written with the prototypic HIV-1 retrovirus in mind, the techniques are described in order to benefit to a larger community.

Acknowledgments: This work was supported by the CNRS and the ANRS to M.M and M.S. and by the Méditerranée Infection - Infectiopole Sud to J.E. We want to thank S. Lainé and J. McKellar for critical reading of the manuscript. We thank PNAS journal and the authors for the permission to use the Fig.3 [34].

Author Contributions: All authors made substantial contributions to the writing of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Agarwal A. Digital Microfluidics: Techniques, Their Applications and Advantages. *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*. 2013;03(03). doi: 10.4172/2155-9538.s8-001.
2. Chacon Orellana LA, Baret JC. Rapid Stabilization of Droplets by Particles in Microfluidics: Role of Droplet Formation. *ChemSystemsChem*. 2019;1(1-2):16-24. doi: 10.1002/syst.201900007.
3. Mashaghi SA, A.; Weitz, D.A.; van Oijen, A.M. Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology. 2016.
4. Malbec R, Chami B, Aeschbach L, Ruiz Buendia GA, Socol M, Joseph P, et al. microLAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes. *Sci Rep*. 2019;9(1):23. doi: 10.1038/s41598-018-36632-5. PubMed PMID: 30631115; PubMed Central PMCID: PMC6328573.
5. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*. 2014;507(7491):181-9. doi: 10.1038/nature13118.
6. Socol M, Ranchon H, Chami B, Lesage A, Victor JM, Bancaud A. Contraction and tumbling dynamics of DNA in shear flows under confinement induced by transverse viscoelastic forces. *Macromolecules*. 2019:1-28.
7. Socol M, Wang R, Jost D, Carrivain P, Vaillant C, Le Cam E, et al. Rouse model with transient intramolecular contacts on a timescale of seconds recapitulates folding and fluctuation of yeast chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(12):6195-207. doi: 10.1093/nar/gkz374. PubMed PMID: 31114898; PubMed Central PMCID: PMC6614813.
8. Bazant MZS, T. M. Induced-Charge Electrokinetic Phenomena: Theory and Microfluidic Applications. *Phys Rev Lett*. 2004;92(6):1-4.
9. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-73. doi: 10.1038/nature05058. PubMed PMID: 16871203.
10. Gale B, Jafek A, Lambert C, Goenner B, Moghimifam H, Nze U, et al. A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects. *Inventions*. 2018;3(3):60. doi: 10.3390/inventions3030060.
11. Hamon M, Hong JW. New tools and new biology: recent miniaturized systems for molecular and cellular biology. *Mol Cells*. 2013;36(6):485-506. doi: 10.1007/s10059-013-0333-1. PubMed PMID: 24305843; PubMed Central PMCID: PMC3887968.

12. de Jong J, Lammertink RG, Wessling M. Membranes and microfluidics: a review. *Lab Chip*. 2006;6(9):1125-39. doi: 10.1039/b603275c. PubMed PMID: 16929391.
13. Rettig JR, Folch A. Large-Scale Single-Cell Trapping And Imaging Using Microwell Arrays. *Anal Chem*. 2005;77(17):5628-34.
14. Rudenko MI, Holmes MR, Ermolenko DN, Lunt EJ, Gerhardt S, Noller HF, et al. Controlled gating and electrical detection of single 50S ribosomal subunits through a solid-state nanopore in a microfluidic chip. *Biosens Bioelectron*. 2011;29(1):34-9. doi: 10.1016/j.bios.2011.07.047. PubMed PMID: 21855314.
15. Jang J, Park JY, Gao G, Cho DW. Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics. *Biomaterials*. 2018;156:88-106. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.030. PubMed PMID: 29190501.
16. Gong MM, Sinton D. Turning the Page: Advancing Paper-Based Microfluidics for Broad Diagnostic Application. *Chem Rev*. 2017;117(12):8447-80. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00024. PubMed PMID: 28627178.
17. Li X, Ballerini DR, Shen W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*. 2012;6(1):11301-1130113. doi: 10.1063/1.3687398. PubMed PMID: 22662067; PubMed Central PMCID: PMC3365319.
18. Margolis DM, Archin NM, Cohen MS, Eron JJ, Ferrari G, Garcia JV, et al. Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection. *Cell*. 2020;181(1):189-206. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.005. PubMed PMID: 32220311.
19. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. *The Lancet*. 1998;352(9142):1725-30. doi: 10.1016/s0140-6736(98)03201-2.
20. Chupradit K, Moonmuang S, Nangola S, Kitidee K, Yasamut U, Mougél M, et al. Current Peptide and Protein Candidates Challenging HIV Therapy beyond the Vaccine Era. *Viruses*. 2017;9(10). doi: 10.3390/v9100281. PubMed PMID: 28961190; PubMed Central PMCID: PMC5691633.
21. Yeo JY, Goh GR, Su CT, Gan SK. The Determination of HIV-1 RT Mutation Rate, Its Possible Allosteric Effects, and Its Implications on Drug Resistance. *Viruses*. 2020;12(3). doi: 10.3390/v12030297. PubMed PMID: 32182845; PubMed Central PMCID: PMC7150816.
22. Cohn LB, Chomont N, Deeks SG. The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell Host Microbe*. 2020;27(4):519-30. doi: 10.1016/j.chom.2020.03.014. PubMed PMID: 32272077.
23. Holmes M, Zhang F, Bieniasz PD. Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication. *PLoS Pathog*. 2015;11(6):e1004961. doi: 10.1371/journal.ppat.1004961. PubMed PMID: 26086614; PubMed Central PMCID: PMC4472667.
24. Mohammadi P, Desfarges S, Bartha I, Joos B, Zangger N, Munoz M, et al. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003161. doi: 10.1371/journal.ppat.1003161. PubMed PMID: 23382686; PubMed Central PMCID: PMC3561177.
25. Mougél M, Houzet L, Darlix JL. When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology*. 2009;6:24. doi: 10.1186/1742-4690-6-24. PubMed PMID: 19261185; PubMed Central PMCID: PMC2656454.
26. Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(10):5486-93. doi: 10.1073/pnas.1920631117. PubMed PMID: 32094182; PubMed Central PMCID: PMC7071919.
27. Dharan A, Bachmann N, Talley S, Zwickelmaier V, Campbell EM. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol*. 2020. doi: 10.1038/s41564-020-0735-8. PubMed PMID: 32483230.
28. Guerrero S, Batisse J, Libre C, Bernacchi S, Marquet R, Paillart JC. HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses*. 2015;7(1):199-218. doi: 10.3390/v7010199. PubMed PMID: 25606970; PubMed Central PMCID: PMC4306834.

29. Ferrer M, Clerte C, Chamontin C, Basyuk E, Laine S, Hottin J, et al. Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(16):7922-34. doi: 10.1093/nar/gkw511. PubMed PMID: 27280976; PubMed Central PMCID: PMC5027490.
30. Mailler E, Bernacchi S, Marquet R, Paillart JC, Vivet-Boudou V, Smyth RP. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. *Viruses.* 2016;8(9). doi: 10.3390/v8090248. PubMed PMID: 27626439; PubMed Central PMCID: PMC5035962.
31. Hurt CB, Nelson JAE, Hightow-Weidman LB, Miller WC. Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers. *Sex Transm Dis.* 2017;44(12):739-46. Epub 2017/11/16. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000719. PubMed PMID: 29140890; PubMed Central PMCID: PMC5718364.
32. Hughes AJ, Herr AE. Microfluidic Western blotting. *PNAS.* 2012;109(52):21450-5.
33. Liu J, Du B, Zhang P, Haleyuririsetty M, Zhao J, Ragupathy V, et al. Development of a microchip Europium nanoparticle immunoassay for sensitive point-of-care HIV detection. *Biosens Bioelectron.* 2014;61:177-83. doi: 10.1016/j.bios.2014.04.057. PubMed PMID: 24880655.
34. Ouyang W, Han J. Universal amplification-free molecular diagnostics by billion-fold hierarchical nanofluidic concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS).* 2019;116.
35. Sia SK, Linder V, Parviz BA, Siegel A, Whitesides GM. An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(4):498-502. doi: 10.1002/anie.200353016. PubMed PMID: 14735545.
36. Li X, Liu X. A Microfluidic Paper-Based Origami Nanobiosensor for Label-Free, Ultrasensitive Immunoassays. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(11):1326-35. doi: 10.1002/adhm.201501038. PubMed PMID: 27122227.
37. Chew KW, Bhattacharya D. Virologic and immunologic aspects of HIV-hepatitis C virus coinfection. *AIDS.* 2016;30(16):2395-404. Epub 2016/10/19. doi: 10.1097/QAD.0000000000001203. PubMed PMID: 27427873; PubMed Central PMCID: PMC5039386.
38. Requena S, Caballero E, Lozano AB, Rios-Villegas MJ, Benito R, Rojo S, et al. Treatment outcome in dually HIV-1 and HIV-2 coinfecting patients living in Spain. *AIDS.* 2019;33(14):2167-72. Epub 2019/08/03. doi: 10.1097/QAD.0000000000002338. PubMed PMID: 31373918.
39. Corstjens PLAM, Chen Z, Zuiderwijk M, Bau HH, Abrams WR, Malamud D, et al. Rapid Assay Format for Multiplex Detection of Humoral Immune Responses to Infectious Disease Pathogens (HIV, HCV, and TB). *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1098(1):437-45. doi: 10.1196/annals.1384.016.
40. Klostranec JM, Xiang Q, Farcas GA, Lee JA, Rhee A, Lafferty EI, et al. Convergence of Quantum Dot Barcodes with Microfluidics and Signal Processing for Multiplexed High-Throughput Infectious Disease Diagnostics. *Nano Letters.* 2007;7(9):2812-8.
41. Zhao C, Liu X. A portable paper-based microfluidic platform for multiplexed electrochemical detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus antibodies in serum. *Biomicrofluidics.* 2016;10(2):1-10. doi: 10.1063/1.4945311].
42. Mendoza C, Lozano AB, Caballero E, Cabezas T, Ramos JM, Soriano V. Antiretroviral Therapy for HIV-2 Infection in Non-Endemic Regions. *AIDS Rev.* 2020;22(1):44-56. Epub 2020/03/14. doi: 10.24875/AIDSRev.M20000029. PubMed PMID: 32167506.
43. Nsagha DS, Njunda AL, Kamga HL, Assob JC, Bongkem EA. HIV-1/HIV-2 co-infection among voluntary counselling and testing subjects at a regional hospital in Cameroon. *Afr Health Sci.* 2012;12(3):276-81. Epub 2013/02/06. doi: 10.4314/ahs.v12i3.5. PubMed PMID: 23382740; PubMed Central PMCID: PMC3557686.
44. Zhang Y, Sun J, Zou Y, Chen W, Zhang W, Xi JJ, et al. Barcoded microchips for biomolecular assays. *Anal Chem.* 2015;87(2):900-6. doi: 10.1021/ac5032379. PubMed PMID: 25513831.
45. Selck DA, Karymov MA, Sun B, Ismagilov RF. Increased robustness of single-molecule counting with microfluidics, digital isothermal amplification, and a mobile phone versus real-time kinetic

- measurements. *Anal Chem.* 2013;85(22):11129-36. doi: 10.1021/ac4030413. PubMed PMID: 24199852; PubMed Central PMCID: PMC3924768.
46. Myers FB, Henrikson RH, Bone J, Lee LP. A Handheld Point-of-Care Genomic Diagnostic System. *PLOS ONE.* 2013;8(8):1-9. doi: 10.1371/.
 47. Prakash R, Kaler KVIS. An integrated genetic analysis microfluidic platform with valves and a PCR chip reusability method to avoid contamination. *Microfluidics and Nanofluidics.* 2007:177-87. doi: 10.1007/s10404-006-0114-7.
 48. Banerjee I, Aralaguppe SG, Lapins N, Zhang W, Kazemzadeh A, Sonnerborg A, et al. Microfluidic centrifugation assisted precipitation based DNA quantification. *Lab Chip.* 2019;19(9):1657-64. doi: 10.1039/c9lc00196d. PubMed PMID: 30931470.
 49. Abrams WR, Barber CA, McCann K, Tong G, Chen Z, Mauk MG, et al. Development of a microfluidic device for detection of pathogens in oral samples using upconverting phosphor technology (UPT). *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:375-88. doi: 10.1196/annals.1384.020. PubMed PMID: 17435143.
 50. Gao Y, Lam AW, Chan WC. Automating quantum dot barcode assays using microfluidics and magnetism for the development of a point-of-care device. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(8):2853-60. doi: 10.1021/am302633h. PubMed PMID: 23438061.
 51. Xu L, Kong J. A multiplexed nucleic acid microsystem for point-of-care detection of HIV co-infection with MTB and PCP. *Talanta.* 2013;117:532-5. doi: 10.1016/j.talanta.2013.08.056. PubMed PMID: 24209377.
 52. Kim YG, Moon S, Kuritzkes DR, Demirci U. Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel. *Biosens Bioelectron.* 2009;25(1):253-8. doi: 10.1016/j.bios.2009.06.023. PubMed PMID: 19665685; PubMed Central PMCID: PMC32746625.
 53. Wang S, Esfahani M, Gurkan UA, Inci F, Kuritzkes DR, Demirci U. Efficient on-chip isolation of HIV subtypes. *Lab Chip.* 2012;12(8):1508-15. doi: 10.1039/c2lc20706k. PubMed PMID: 22391989; PubMed Central PMCID: PMC3777392.
 54. Wang S, Ip A, Xu F, Giguel FF, Moon S, Akay A, et al. Development of a microfluidic system for measuring HIV-1 viral load. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2010;7666:76661H. doi: 10.1117/12.853132. PubMed PMID: 24478824; PubMed Central PMCID: PMC3903267.
 55. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 2017;47(10):1584-797. doi: 10.1002/eji.201646632. PubMed PMID: 29023707.
 56. Cheung K, Gawad S, Renaud P. Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation. *Cytometry A.* 2005;65(2):124-32. doi: 10.1002/cyto.a.20141. PubMed PMID: 15825181.
 57. Cheng X, Gupta A, Chen C, Tompkins RG, Rodriguez W, Toner M. Enhancing the performance of a point-of-care CD4+ T-cell counting microchip through monocyte depletion for HIV/AIDS diagnostics. *Lab Chip.* 2009;9(10):1357-64. doi: 10.1039/b818813k. PubMed PMID: 19417901; PubMed Central PMCID: PMC34064257.
 58. Murphy FJ, Reen DJ. Differential expression of function-related antigens on newborn and adult monocyte subpopulations. *Immunology.* 1996;89(4):587-91. Epub 1996/12/01. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-788.x. PubMed PMID: 9014826; PubMed Central PMCID: PMC1456577.
 59. Wintergerst ES, Jelk J, Asmis R. Differential expression of CD14, CD36 and the LDL receptor on human monocyte-derived macrophages. A novel cell culture system to study macrophage differentiation and heterogeneity. *Histochem Cell Biol.* 1998;110(3):231-41. Epub 1998/09/28. doi: 10.1007/s004180050285. PubMed PMID: 9749957.
 60. Moon S, Gurkan UA, Blander J, Fawzi WW, Aboud S, Mugusi F, et al. Enumeration of CD4+ T-cells using a portable microchip count platform in Tanzanian HIV-infected patients. *PLoS One.* 2011;6(7):e21409. doi: 10.1371/journal.pone.0021409. PubMed PMID: 21754988; PubMed Central PMCID: PMC3130745.

61. Moon S, Keles HO, Ozcan A, Khademhosseini A, Haeggstrom E, Kuritzkes D, et al. Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(11):3208-14. doi: 10.1016/j.bios.2009.03.037. PubMed PMID: 19467854; PubMed Central PMCID: PMC2733855.
62. Jokerst JV, Floriano PN, Christodoulides N, Simmons GW, McDevitt JT. Integration of semiconductor quantum dots into nano-bio-chip systems for enumeration of CD4+ T cell counts at the point-of-need. *Lab Chip.* 2008;8(12):2079-90. doi: 10.1039/b817116e. PubMed PMID: 19023471; PubMed Central PMCID: PMC2847472.
63. Glynn M, Kirby D, Chung D, Kinahan DJ, Kijanka G, Ducree J. Centrifugo-Magnetophoretic Purification of CD4+ Cells from Whole Blood Toward Future HIV/AIDS Point-of-Care Applications. *J Lab Autom.* 2014;19(3):285-96. doi: 10.1177/2211068213504759. PubMed PMID: 24056858.
64. Howard AL, Pezzi HM, Beebe DJ, Berry SM. Exclusion-Based Capture and Enumeration of CD4+ T Cells from Whole Blood for Low-Resource Settings. *J Lab Autom.* 2014;19(3):313-21. doi: 10.1177/2211068213509248. PubMed PMID: 24142472; PubMed Central PMCID: PMC4300285.
65. Liu Q, Chernish A, DuVall JA, Ouyang Y, Li J, Qian Q, et al. The ARTmuS: a novel microfluidic CD4+ T-cell enumeration system for monitoring antiretroviral therapy in HIV patients. *Lab Chip.* 2016;16(3):506-14. doi: 10.1039/c5lc01153a. PubMed PMID: 26687070.
66. Wasserberg D, Zhang X, Breukers C, Connell BJ, Baeten E, van den Blink D, et al. All-printed cell counting chambers with on-chip sample preparation for point-of-care CD4 counting. *Biosens Bioelectron.* 2018;117:659-68. doi: 10.1016/j.bios.2018.07.002. PubMed PMID: 30005387.
67. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(5):417-23. Epub 2006/04/20. doi: 10.1038/nri1840. PubMed PMID: 16622477.
68. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med.* 2004;10(8):806-10. Epub 2004/08/03. doi: 10.1038/nm0804-806. PubMed PMID: 15286782.
69. Zhu H, Stybayeva G, Macal M, Ramanculov E, George MD, Dandekar S, et al. A microdevice for multiplexed detection of T-cell-secreted cytokines. *Lab Chip.* 2008;8(12):2197-205. doi: 10.1039/b810244a. PubMed PMID: 19023487.
70. Li W, Gao Y, Pappas D. A complementary method to CD4 counting: measurement of CD4+/CD8+ T lymphocyte ratio in a tandem affinity microfluidic system. *Biomedical Microdevices.* 2015;17(113):1-9. doi: 10.1007/s10544-015-0023-1).
71. Hassan U, Watkins NN, Reddy B, Jr., Damhorst G, Bashir R. Microfluidic differential immunocapture biochip for specific leukocyte counting. *Nat Protoc.* 2016;11(4):714-26. doi: 10.1038/nprot.2016.038. PubMed PMID: 26963632; PubMed Central PMCID: PMC4893332.
72. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol.* 2019;27(10):878-91. doi: 10.1016/j.tim.2019.06.002. PubMed PMID: 31262533; PubMed Central PMCID: PMC6744290.
73. Lu CH, Zhang Y, Tang SF, Fang ZB, Yang HH, Chen X, et al. Sensing HIV related protein using epitope imprinted hydrophilic polymer coated quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron.* 2012;31(1):439-44. doi: 10.1016/j.bios.2011.11.008. PubMed PMID: 22143073.
74. Novikova M, Zhang Y, Freed EO, Peng K. Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. *Viol Sin.* 2019;34(2):119-34. Epub 2019/04/28. doi: 10.1007/s12250-019-00095-3. PubMed PMID: 31028522; PubMed Central PMCID: PMC6513821.
75. Lau D, Walsh JC, Peng W, Shah VB, Turville S, Jacques DA, et al. Fluorescence Biosensor for Real-Time Interaction Dynamics of Host Proteins with HIV-1 Capsid Tubes. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(38):34586-94. doi: 10.1021/acsami.9b08521. PubMed PMID: 31483592.
76. Peng W, Shi J, Marquez CL, Lau D, Walsh J, Faysal KMR, et al. Functional analysis of the secondary HIV-1 capsid binding site in the host protein cyclophilin A. *Retrovirology.* 2019;16(1):10. doi: 10.1186/s12977-019-0471-4. PubMed PMID: 30947724; PubMed Central PMCID: PMC6449974.

77. Zhang L, Wang J, Roebelen J, Tripathi A. A simple microfluidic assay for the detection of ligation product. *Mol Diagn Ther.* 2015;19(1):59-64. doi: 10.1007/s40291-015-0129-4. PubMed PMID: 25609550.
78. Razooky BS, Gutierrez E, Terry VH, Spina CA, Groisman A, Weinberger LS. Microwell devices with finger-like channels for long-term imaging of HIV-1 expression kinetics in primary human lymphocytes. *Lab Chip.* 2012;12(21):4305-12. doi: 10.1039/c2lc40170c. PubMed PMID: 22976503; PubMed Central PMCID: PMC3589574.
79. Ramji R, Wong VC, Chavali AK, Gearhart LM, Miller-Jensen K. A passive-flow microfluidic device for imaging latent HIV activation dynamics in single T cells. *Integr Biol (Camb).* 2015;7(9):998-1010. doi: 10.1039/c5ib00094g. PubMed PMID: 26138068; PubMed Central PMCID: PMC4558391.
80. Yeh HC, Puleo CM, Lim TC, Ho YP, Giza PE, Huang RC, et al. A microfluidic-FCS platform for investigation on the dissociation of Sp1-DNA complex by doxorubicin. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(21):1-9. doi: 10.1093/nar/gkl787. PubMed PMID: 17108358; PubMed Central PMCID: PMC1669725.
81. Fourtounis J, Falgout JP, Sayegh CE. Assessing protein-RNA interactions using microfluidic capillary mobility shift assays. *Anal Biochem.* 2011;411(1):161-3. doi: 10.1016/j.ab.2010.11.042. PubMed PMID: 21130065.
82. Vu HN, Li Y, Casali M, Irimia D, Megeed Z, Yarmush ML. A microfluidic bioreactor for increased active retrovirus output. *Lab Chip.* 2008;8(1):75-80. doi: 10.1039/b711577f. PubMed PMID: 18094764.
83. Pang Y, Song H, Kim JH, Hou X, Cheng W. Optical trapping of individual human immunodeficiency viruses in culture fluid reveals heterogeneity with single-molecule resolution. *Nat Nanotechnol.* 2014;9(8):624-30. doi: 10.1038/nnano.2014.140. PubMed PMID: 25038779; PubMed Central PMCID: PMC4125448.
84. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, Tover A, Berger E, Jungbauer A. Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis. *J Chromatogr A.* 2017;1487:89-99. doi: 10.1016/j.chroma.2016.12.085. PubMed PMID: 28110946.
85. Surawathanawises K, Kundrod K, Cheng X. Microfluidic devices with templated regular macroporous structures for HIV viral capture. *Analyst.* 2016;141(5):1669-77. doi: 10.1039/c5an02282g. PubMed PMID: 26899457; PubMed Central PMCID: PMC4765901.
86. Shafiee H, Jahangir M, Inci F, Wang S, Willenbrecht RB, Giguel FF, et al. Acute on-chip HIV detection through label-free electrical sensing of viral nano-lysate. *Small.* 2013;9(15):2553-63. doi: 10.1002/smll.201202195. PubMed PMID: 23447456; PubMed Central PMCID: PMC3761882.
87. Shafiee H, Kanakasabapathy MK, Juillard F, Keser M, Sadasivam M, Yuksekkaya M, et al. Printed Flexible Plastic Microchip for Viral Load Measurement through Quantitative Detection of Viruses in Plasma and Saliva. *Sci Rep.* 2015;5:9919. doi: 10.1038/srep09919. PubMed PMID: 26046668; PubMed Central PMCID: PMC4456945.

2. Lois physiques de la Microfluidique

2.1. Fluide Newtonien

On appelle **fluide newtonien** (en hommage à Isaac Newton) un fluide dont la loi contrainte – vitesse de déformation est linéaire. La constante de proportionnalité est appelée viscosité. En termes usuels, cela signifie que le fluide continue de s'écouler indépendamment des forces extérieures qui agissent sur lui. Par exemple, l'eau est un fluide newtonien parce qu'elle continue d'exhiber les propriétés d'un fluide quelle que soit la vitesse à laquelle elle est agitée. Les solutions aqueuses et les huiles de faibles viscosités, la plupart des solvants et l'air sont des exemples de fluides newtoniens. Pour un fluide newtonien, la viscosité, par définition, ne dépend que de la température et de la pression (mais elle dépend aussi de la composition chimique du fluide si ce n'est pas un corps pur), et non pas des forces agissant sur l'élément de fluide. En d'autre terme, c'est le cas où la contrainte de cisaillement est une fonction explicite du taux de cisaillement (Wrobel, 2020). Elle est donnée par la formule suivante :

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy}$$

τ représente la contrainte de cisaillement (Pa) qui est générée dans la même direction que le flux du fluide. μ est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s). C'est une mesure de combien un fluide résiste au flux ou bien à la déformation due aux contraintes de cisaillement (Pisano, 2017). Pour un fluide newtonien, la viscosité dynamique est indépendante du gradient de vitesse et $\frac{dv}{dy}$ représente le taux de cisaillement σ (s^{-1}). Il s'agit de la différence de la vitesse du fluide entre deux couches successives de fluide visqueux tout au long de la hauteur du microcanal.

Comme application en biologie, les contraintes de cisaillement que les cellules subissent à l'intérieur d'un microcanal créent des modifications morphologiques des cellules cellulaires. Dans ce contexte, des études approfondies ont été effectuées sur la dynamique et la déformation des globules rouges suite aux changements du taux de cisaillement. Leurs propriétés mécaniques ainsi que leur comportement sont élucidés (Dupire et al., 2012a; Fedosov et al., 2014).

2.2. Écoulements des fluides à l'échelle micro- et nanométrique

Aux petites dimensions, les phénomènes physiques macroscopiques ne subissent pas seulement une diminution linéaire de leurs effets. Certains phénomènes négligeables deviennent prépondérants, comme la capillarité ; par contre, d'autres forces telles que la gravité deviennent négligeables. Afin d'appréhender plus facilement les caractéristiques d'un système microfluidique, plusieurs grandeurs sans dimension ont été introduites (Squires and Quake, 2005). La plus répandue est probablement le nombre de Reynolds Re , proposé en 1883 (Reynolds, 1883), qui caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité. Les systèmes microfluidiques sont généralement caractérisés par un petit nombre de Reynolds : les forces de viscosité sont prépondérantes. Ce comportement se traduit par des écoulements laminaires. On utilise également le nombre de Péclet Pe , liant la convection et la diffusion (thermique ou massique),

En plus de l'application d'une différence de pression entre les deux extrémités du microcanal pour induire l'écoulement du fluide, un phénomène domine à l'échelle micrométrique. En effet, quand les canaux sont de l'ordre de quelques microns, le ratio surface (S) / volume (V) augmente et les forces de capillarité prédominent. C'est l'adhérence du liquide aux surfaces des microcanaux qui l'emporte ce qui permet la montée naturelle des liquides dans des microcanaux verticaux, malgré les forces de gravité (Beebe et al., 2002).

Nombre de Reynolds

La première étape à effectuer lors de la modélisation d'un flux est de prédire s'il s'agit d'un flux laminaire ou turbulent. Le profil est déterminé selon le nombre de Reynolds (Re) qui est défini comme le ratio des forces d'inertie sur les forces visqueuses agissant sur le fluide (Whitesides and Stroock, 2001). Il est calculé par la formule suivante :

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu}$$

ρ est la densité du fluide (Kg/m^3), v est sa vitesse caractéristique (m/s) et D_h représente le diamètre hydraulique (m) qui dépend de la géométrie de la section transversale du microcanal, et μ c'est la viscosité dynamique.

La valeur critique Re est de l'ordre de 2300 définie expérimentalement en utilisant un cylindre. Dans le cas où $Re < 2300$, le flux est considéré laminaire. En revanche, s'il dépasse cette valeur il devient turbulent ($Re > 2300$) (**Figure 21**). Le flux traversant les microcanaux est laminaire dans la majorité des cas. Ceci montre que les forces d'inertie sont négligeables et que les forces visqueuses dominent. Par définition, un flux laminaire est un flux qui se caractérise par une vitesse des particules du fluide qui n'est pas une fonction aléatoire du temps. Ceci évite le mélange des différents fluides une fois ils rentrent en contact les uns avec les autres dans le microcanal (Beebe et al., 2002).

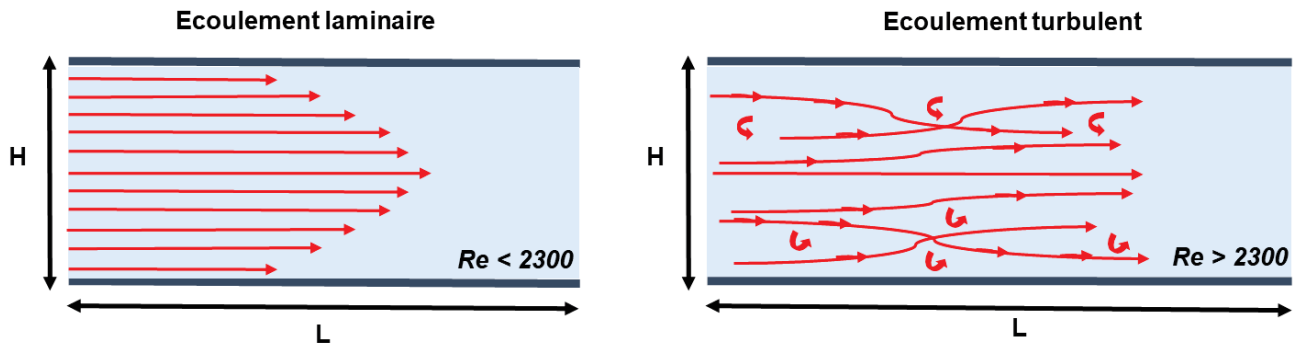


Figure 21: Illustration des deux types d'écoulement d'un fluide

Le type d'écoulement d'un fluide dépend du nombre de Reynold: si $Re < 2300$, l'écoulement est laminaire et les lignes du flux restent parallèles les unes aux autres tout au long du microcanal (à gauche). Dans ce cas, lorsque deux fluides rentrent en contact ils ne se mélangent pas. Par contre, lorsque $Re > 2300$, le flux est dit turbulent. Les lignes du flux interfèrent les unes avec les autres (à droite). Ceci est responsable du mélange des solutions une fois elles seront en contact.

Nombre de Péclet

Un deuxième paramètre à étudier dans la Microfluidique continue est le nombre de Péclet (Pe). Celui-ci représente le rapport entre le transfert par convection forcée et le transfert par diffusion. Il est calculé par la formule suivante :

$$Pe = \frac{Lv}{D}$$

v représente la vitesse du fluide (m/s) et D représente le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$).

L'augmentation de la valeur de Pe signifie que le transport des particules dans le microcanal s'effectue majoritairement par convection. Par contre, plus Pe diminue plus la diffusion l'emporte et joue un rôle majeur dans le transport des particules (Zhang et al., 2016).

Dans le contexte de la diffusion, celle-ci est le processus par lequel les particules en suspension dans le microcanal se déplacent par leur mouvement Brownien. Elle résulte de la collision fréquente qui s'effectue entre ces particules et les molécules du fluide (Zhang et al., 2016). La distance quadratique moyenne qu'une particule diffuse en temps t (s) est calculée par la formule suivante :

$$\langle r^2 \rangle = 2nDt \text{ (} n \text{ est le nombre de degré de liberté)}$$

Le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) est calculé par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{KT}{6\pi\mu a}$$

K est la constante de Boltzmann ($\sim 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$), **T** est la température absolue (K) et **a** représente le rayon de la particule en suspension (m).

Le modèle du fluide newtonien joue un rôle central en mécanique des fluides, puisque hormis le modèle du fluide parfait incompressible, il fournit le modèle le plus simple du comportement fluidique. L'hypothèse du fluide newtonien est à la base :

1. Des équations de Navier-Stokes ;
2. De la solution de Poiseuille pour l'écoulement laminaire des fluides visqueux.

1. Equations de Navier – Stokes

Les équations de Navier – Stokes sont des équations aux dérivées partielles non linéaires décrivant le mouvement des fluides newtoniens. On obtient les équations de Navier-Stokes en appliquant la relation de conservation à la masse volumique ρ , à la quantité de mouvement \mathbf{V} et à l'énergie totale. L'expression des équations de continuité et de quantité de mouvement sont considérablement simplifiées quand l'écoulement d'un fluide est dit incompressible et homogène, donc, lorsque l'on peut négliger ses variations de masse volumique. Cette hypothèse est vérifiée pour l'eau ou pour ses solutions. De ce fait, l'équation de l'énergie est découplée des équations de continuité et de quantité de mouvement, c'est-à-dire qu'on peut déterminer la vitesse et la pression indépendamment de l'équation de l'énergie. On obtient alors :

- **L'équation d'incompressibilité** (se confondant avec l'équation de bilan de la masse pour un fluide homogène)

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{V} = 0$$

○ **L'équation de bilan de la quantité de mouvement :**

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho (\vec{v} \cdot \text{grad}) \vec{v} = \rho \vec{f} - \text{grad } p + \mu \Delta \vec{v} \quad (\text{Eq. 1})$$

Dans la plupart des cas, on écrit l'équation de Stokes pour un écoulement stationnaire (ou quasi-stationnaire) symétrique et laminaire, quand les termes inertiels à gauche de **Eq.1** (équivalents à l'accélération du fluide) sont négligés, de la façon suivante :

$$\mu \Delta \vec{v} = \text{grad } p - p \vec{f} \quad (\text{Eq. 2})$$

Où \vec{v} est la vitesse du fluide, p est la pression dans le fluide (Pa), ρ est la masse volumique du fluide (Kg/m³); μ est la viscosité dynamique du fluide ; \vec{f} est une force massique (N) s'exerçant dans le fluide (la pesanteur par exemple) ; $\text{grad } p$ et Δ sont respectivement les opérateurs différentiels gradient et laplacien.

2. Ecoulement de Poiseuille

La loi de Poiseuille, également appelée loi de Hagen-Poiseuille, décrit l'écoulement laminaire d'un liquide visqueux dans un canal cylindrique (tuyau). Un écoulement Poiseuille est un écoulement qui suit la loi Poiseuille. Elle énonce la relation entre le débit d'un écoulement (**Q**) (m³/s), la différence de pression entre les deux extrémités du canal (**ΔP**) (Pa), la viscosité du fluide (**μ**), la longueur (**L**) et le rayon (**R**) du canal (m) (Pisano, 2017).

Les équations régissant l'écoulement de Hagen-Poiseuille peuvent être dérivées directement des équations de la quantité de mouvement de Stokes en coordonnées cylindriques 3D (r, θ, x), **Eq.2**, en faisant l'ensemble des hypothèses suivantes :

- Les composants radial et azimutale de la vitesse du fluide, \mathbf{u} , sont égales à zéro
- L'écoulement est axisymétrique

On obtient l'équation suivante:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial u}{\partial r} \right) = \frac{1}{\mu} \frac{dp}{dx}$$

Si l'on considère L la longueur du tuyau et ΔP (haute pression moins basse pression) la différence de pression entre les deux extrémités du tuyau, alors :

$$-\frac{dp}{dx} = \frac{\Delta P}{L} = G \text{ est constant afin d'avoir des solutions valides (avec } G > 0 \text{)}$$

La solution finale représente le profil parabolique de vitesses :

$$u(r) = \frac{G}{4\mu} * (R^2 - r^2)$$

La vitesse maximale se produit au niveau de la ligne centrale du tuyau ($r = 0$)

$$u_{max} = \frac{G}{4\mu} * R^2$$

La vitesse moyenne du fluide s'obtient en intégrant les vitesses sur la section transversale du canal:

$$u_{moy} = \frac{1}{2} * u_{max}$$

D'où :

$$Q = S * u_{moy} = \pi R^2 * \frac{1}{2} * u_{max} = \Delta P \frac{\pi R^4}{8\mu L}$$

Au cours de son écoulement le long du microcanal, le fluide présentera une résistance hydrodynamique (Rh) qui permet de calculer la perte de charge induite par les forces de frottements du liquide en mouvement. La résistance est donnée par l'équation suivante :

$$Rh = \frac{8\mu L}{\pi R^4}$$

Ainsi, l'équation Hagen-Poiseuille se simplifie en :

$$Q = \frac{\Delta P}{Rh}$$

Pour un écoulement laminaire d'un fluide newtonien non compressible dans des canaux rectangulaires et en considérant l'ensemble des hypothèses suivantes: l'écoulement est stationnaire et symétrique, la conservation de la masse est respectée, et la vitesse est indépendante de x et seule la composante x de la vitesse est non nulle, l'équation de Stokes pourrait être réduite à :

$$\frac{d^2 v(y, z)}{dy^2} + \frac{d^2 v(y, z)}{dz^2} = -\frac{\Delta P}{\mu L}$$

Où ΔP est la perte de charge le long du canal (L) et μ est la viscosité dynamique du liquide.

Considérons la condition de non-glissade au niveau des deux parois d'un microcanal ($v(0) = v(h) = 0$) de hauteur h et de largeur w , le débit Q et la vitesse moyenne du flux v dans un canal de coupe transversale rectangulaire seront données par les formules suivantes : (Bruus, 2007)

$$Q = \frac{\Delta P h^3 w}{12\mu L} \delta = \frac{\Delta P}{R_h} \quad \text{et} \quad v = \frac{Q}{S} = \frac{\Delta P}{R_h w h}$$

$$\text{Où } \delta = 1 - \sum_{n, \text{odd}}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{195}{\pi^5} \frac{h}{w} \text{TANH} \left(n\pi \frac{w}{2h} \right) \quad \text{et} \quad R_h = \frac{12\mu L}{h^3 w \delta}$$

δ ne dépend que du rapport d'aspect du canal et tend vers 1 pour les canaux très larges dans lesquels le profil de vitesse est parabolique.

La condition de non-glissade ou bien « no-slip condition » suppose qu'au niveau des parois le fluide est très lent. Elle dépend de divers facteurs physico-chimiques tels que le taux de cisaillement, le mouillage des microcanaux, la charge de surface et d'autres paramètres (Amini et al., 2014; Lauga et al., 2007).

Dans un flux laminaire, le profil de la distribution de la vitesse suit une fonction parabolique (**Figure 22**). La vitesse est maximale au milieu du microcanal et se réduit progressivement tout en éloignant du milieu pour devenir nulle au niveau des parois du microcanal (Pisano, 2017).

Dans une première approximation, si $h \ll w$ et L , à n'importe quel position z au niveau du microcanal (avec l'origine en $O(0,0,0)$ fixé à mi-hauteur), la vitesse peut être calculée par la formule suivante (Wang et al., 1997) :

$$V(z) = \frac{h^2 \Delta P}{8\mu L} \left[1 - \left(\frac{2z}{h} \right)^2 \right]$$

Avec h la hauteur du microcanal, L sa longueur et ΔP la différence de pression appliquées entre les deux extrémités du canal.

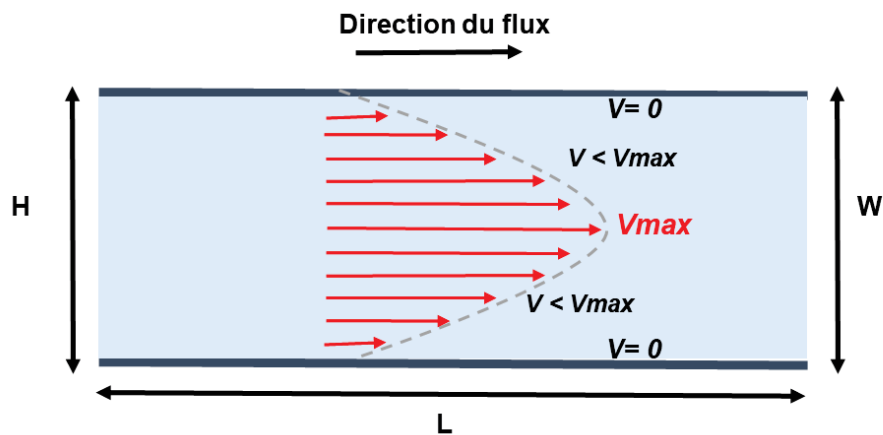


Figure 22 : Illustration du profil de distribution de la vitesse du flux dans un canal rectangulaire quand $H \ll L$ et W

Dans un canal rectangulaire à flux laminaire, la vitesse du flux a un profil parabolique. Elle est maximale au milieu du microcanal ($H/2$) et se réduit en s'éloignant pour s'annuler au niveau des parois. H , L et W représentent la hauteur, la longueur et la largeur du microcanal, respectivement.

En conclusion, plusieurs phénomènes physiques dominant à l'échelle micrométrique et contrôlent l'écoulement du fluide. A son tour, ce dernier joue un rôle primordial dans la distribution des nanoparticules au sein des microcanaux et affecte les propriétés biophysiques des cellules étudiées.

Partie 3 : Quantification de la production virale

A partir d'échantillons de patients infectés par le VIH-1 (sang, sérum), les virus sont détectés et quantifiés par des techniques moléculaires basées sur l'amplification des acides nucléiques telles que la PCR en temps réel (qRT-PCR). De même, la quantification peut s'effectuer par des méthodes qui mettent en évidence les protéines virales telles que le test ELISA qui permet la quantification de la protéine p24 (Chun et al., 1997; Hockett et al., 1999; Hurt et al., 2017) et d'autres techniques qui se basent sur l'utilisation des billes neutralisantes conjuguées aux anticorps gp120. Elles présentent un système de diagnostic spécifique et rapide pour détecter et quantifier les particules VIH-1 (Kim et al., 2009). Ces composants viraux peuvent être de même détectés et localisés grâce à des techniques microscopiques à partir de tissus de patients infectés telles que l'hybridation *in situ*, l'analyse d'image quantitative et l'immunohistochimie (De Boer et al., 2010; Haase et al., 1996).

Ces techniques ont montré leur efficacité dans la détection et la quantification de composants viraux (ARNg, protéines, CA, Env) mais elles débouchent rarement sur le calcul du nombre de particules virales, sachant que la stœchiométrie de CA et Env par virions sont encore sujet à controverse et peuvent varier d'une particule à l'autre (Bachrach et al., 2005; Brandenburg et al., 2015; Briggs et al., 2004).

Les études fondamentales des étapes tardives du VIH (assemblage, bourgeonnement et relargage) sont souvent réalisées avec des VLPs fluorescents qui représentent le modèle biologique le plus simple. Elles ouvrent la porte aux études de microscopie de fluorescence telle que la spectrofluorométrie. L'analyse des surnageants de cellules HEK 293 productrices des VLP-GFP a été effectuée à l'aide d'un spectrofluoromètre et les unités de fluorescence relatives (RFU) obtenues sont converties en masse de p24 puis en concentration particules/ml. Malgré la simplicité de cette technique, elle ne permet pas de distinguer les monomères Gag-GFP des molécules assemblées. De plus, elle est 1000 fois moins sensible que l'ELISA vue que sa limite inférieure de détection est de 10 ng p24/ml alors que celle d'ELISA est de 10 pg p24/ml ce qui correspond à 10^7 et 10^4 particules/ml, respectivement (Gutierrez-Granados et al., 2013) ce qui limite son utilisation pour des solutions inférieures à 10^7 particules/ml. D'autre part, les techniques de microscopies à haute résolution ont montré une bonne efficacité de quantification des VLPs et de la détermination de leurs tailles. On distingue les techniques TEM et Cryo-TEM (Cryo-

Transmission Electron Microscopy), SEM (Scanning Electron Microscopy) et SRFM (Super Resolution Fluorescence Microscopy). En terme de concentration, ces techniques ont montré une bonne correspondance avec les techniques standard utilisées. En revanche, la bonne expertise qu'elles exigent ainsi que l'équipement qu'elles nécessitent limitent leur utilisation (Gonzalez-Dominguez et al., 2020a, b).

Les avancées dans le domaine des nanotechnologies ont permis l'émergence de nouvelles techniques de quantification des nanoparticules. La méthode de chromatographie par exclusion de taille représente une technique automatisée à haut débit et est utilisée pour l'analyse des échantillons de nanoparticules dont la concentration varie entre 10^9 et 10^{10} particules/ml. Ceci montre qu'à des concentrations $< 10^9$ particules/ml cette technique est inapplicable (Steppert et al., 2017). En revanche, la technique NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) est 1000 fois plus sensible que la chromatographie et permet l'analyse des solutions ayant une concentration variant entre 10^7 et 10^9 particules/ml avec des nanoparticules ayant une taille entre 30 et 1000 nm. C'est une technique à double fonction : elle permet de déterminer la concentration des nanoparticules en suspension et d'établir le profil de distribution de tailles en utilisant l'équation de Stokes-Einstein qui énonce la relation entre la diffusion des nanoparticules et leur taille (Filipe et al., 2010). Bien que la manipulation de l'appareil nécessite un ajustement minutieux de plusieurs paramètres, la simplicité de la technique et la rapidité de l'analyse en font une technique de référence. Elle présente l'avantage d'étudier toutes sortes de nanoparticules d'origine virale ou cellulaire (EVs), fluorescentes ou non (Le Saux et al., 2020). Etant donné que les EVs partagent les mêmes aspects en termes de taille, densité et caractéristiques de dispersion de la lumière que les virus, il est bon de travailler avec des VLP-GFP pour les discriminer des EVs. Dans ce contexte, des cytomètres en flux ont été modifiés afin de détecter les nanoparticules à l'échelle de la particule unique. Il s'agit de la virométrie en flux. Elle a été largement utilisée par Lavado-Garcia et al qui ont montré que la transfection des cellules HEK 293 par le plasmide HIV Gag-GFP change la biogenèse des EVs (Lavado-Garcia et al., 2020). Ceci se traduit par une réduction de la concentration des EVs ayant un diamètre entre 350 et 400 nm, et une augmentation des petites EVs (30-200 nm). Cette technique se caractérise par une limite de détection (LOD) de 80 à $\sim 10^8$ particules/ml, soit ~ 1250 fois plus sensible que l'ELISA (Bonar and Tilton, 2017). Elle a été aussi utilisée pour l'étude du rétrovirus de la leucémie murine (MLV) (Renner et al., 2020; Tang et al.,

2017) . Plusieurs paramètres sont à considérer comme l'instrument à utiliser, la méthode de calibration, les paramètres d'étalonnage et la bonne préparation de l'échantillon (Zamora and Aguilar, 2018).

Les avantages et les limitations de chaque technique sont présentés dans le **Tableau 1**. Toutes ces approches ont été utilisées pour quantifier des particules virales dans des surnageants de cellules en culture, et donc de population de cellules. On aurait pu extrapoler de ces valeurs la production virale à la cellule unique, si le nombre exact de cellules productrices avait été connu.

Technique	LOD (particules / ml)	Avantages	Limitations
ELISA	10^4	Grande sensibilité	Longue procédure pour le traitement d'échantillon
Spectrofluorométrie	10^7	Quantification fiable en corrélant les unités de fluorescence avec la quantité p24	Pas de discrimination entre monomères Gag-GFP et molécules assemblées
			1000x moins sensible que le test ELISA
Microscopie à super-résolution (TEM / SEM / Cryo-TEM / SRFM)	-	Caractérisation des nanoparticules (taille et diamètre)	Expertise demandée
Chromatographie par exclusion de taille	10^9	Automatisation à haut débit	Travail laborieux dépendant du type d'échantillon
NTA	10^7	Détection en fluorescence et en lumière diffusée	Variabilité des résultats dépendant des paramètres d'acquisition
		Distribution de taille	
Cytomètre en flux	$\sim 8 \times 10^1$	1250x plus sensible que le test ELISA	Variabilité des résultats dépendante de la machine utilisée et des paramètres fixés

Tableau 1: Comparaison des différentes techniques de quantification de virus à partir de surnageants de cellules en culture

Pour chaque technique, la LOD inférieure, les avantages et les limitations sont donnés.

Objectifs

Le VIH-1 dépend de la machinerie cellulaire pour se répliquer et produire de nouvelles particules virales. La dissémination peut se faire directement de cellule à cellule (Martin et al., 2009), mais aussi par une libération des virions dans le milieu extracellulaire puis infection de nouvelles cellules. Nous profitons de cette deuxième voie de propagation pour étudier la cinétique de production de virus dans le milieu extracellulaire. Nous faisons l'hypothèse que le virus doit s'adapter à son hôte, c'est à dire produire le maximum de virus sans tuer la cellule et ceci durant toute la durée de vie de son hôte. La mort cellulaire peut être naturelle ou induite par l'effet cytopathique de la réplication virale ou bien de la réponse immunitaire suite à l'infection par le virus. Nous pensons que pour une cellule de courte durée de vie, comme les lymphocytes T activés, la production virale sera rapide et massive et à l'inverse, elle sera plus faible et sur une période plus longue pour une cellule avec une durée de vie plus longue, comme les macrophages et les lymphocytes T quiescents.

Des modèles mathématiques ont été développés pour décrire les stratégies possibles de production virale. Les premiers modèles mathématiques supposaient que le taux de production virale était constant durant toute la durée de vie de la cellule (Perelson et al., 1996). Plus tard, les modèles ont intégré le taux de mortalité cellulaire, le taux de production virale ainsi que le nombre total de particules virales produites pendant la durée de vie de la cellule (Gilchrist et al., 2004; Nelson and Gilchrist, 2004). Voici les différents cas de figures possibles (**Figure 23**).

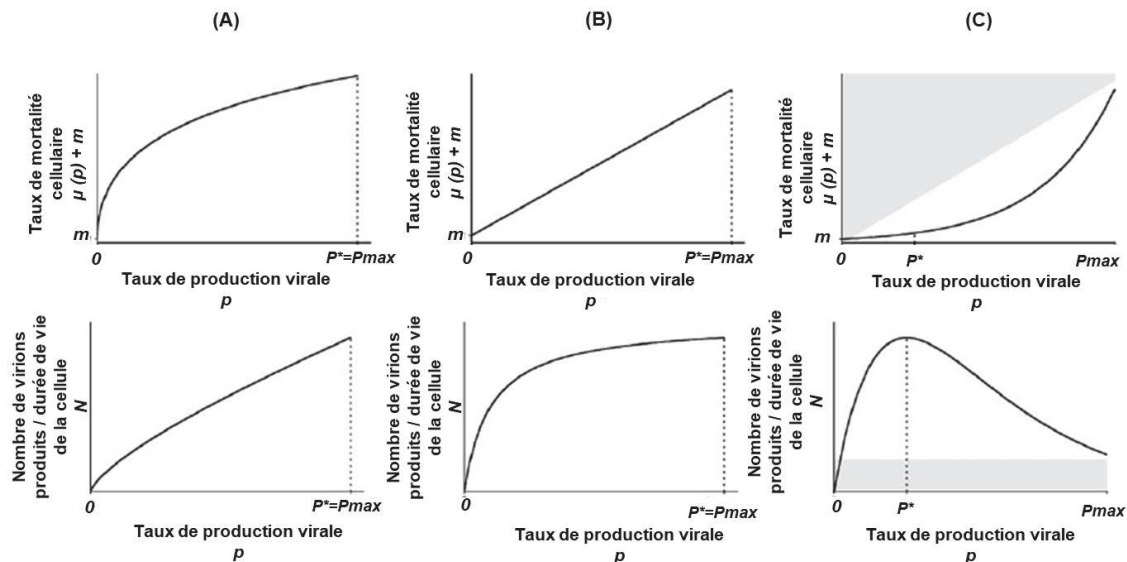


Figure 23: Modélisation mathématique de la variation du taux de production virale en fonction de la mortalité cellulaire.

Le taux de mortalité cellulaire ($\mu(p)+m$) et du nombre de virions produits durant la durée de vie de la cellule (N) avec le taux de production virale p pour trois relations possibles entre μ et p . Le taux de production virale p^* maximise N au sein de l'intervalle biologique possible des taux de production, de 0 à p_{max} . **(A)**, **(B)** et **(C)** représentent la variation du taux de mortalité cellulaire $\mu(p)$ et le nombre de virions produits (N) en fonction de p lorsque $\mu(p)$ est une fonction de décélération, linéaire ou d'accélération de p , respectivement. Dans le cas des fonctions décélérée et linéaire, N augmente en fonction de p et est à son maximum à p_{max} . Par contre, dans le cas **(C)**, il existe un taux de production limité auquel N est à son maximum. Les zones grises représentent les régions où le critère de persistance de l'infection n'est pas rempli (Adapté de (Gilchrist et al., 2004)).

Seule une étude expérimentale de la production virale nous permettra de trancher parmi ces modèles. Étonnamment il y a très peu de données quantitatives dans la littérature sur la production de VIH-1 par des cellules en culture. En effet, les techniques de microscopie telles que le TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescent Microscope) présentent des limitations sur la quantification du nombre de particules virales relarguées dues à la saturation du signal. Ces limitations sont dues au fait que les particules virales restent coincées entre la MP et la lamelle microscopique qui sont distantes de 20-40 nm, soit parce qu'un grand nombre de VLPs restent attachés à la surface cellulaire et seront sujets au photobleaching (Jouvenet et al., 2008). Les premières données datent depuis 2 ans avec l'arrivée du NTA et dernièrement la microscopie SRFM qui ont permis l'étude à la cellule unique (Gonzalez-Dominguez et al., 2020b). Mais à ma connaissance, il n'y a pas d'étude sur la production virale en temps réel.

Le but de mon projet de thèse était de développer un système de haute sensibilité permettant l'étude en temps réel de la libération virale à l'échelle de la cellule unique. Il est important d'être à la cellule unique car dans une population de cellules la cinétique de production virale sera hétérogène. J'ai procédé par étapes :

- 1- Développer un système de capture qui permet d'emprisonner une cellule unique et de la maintenir dans les conditions physiologiques optimales pour assurer sa survie en exerçant un minimum de contraintes de cisaillement. Le système doit être manipulé d'une façon à éviter toute contamination de virions provenant d'autres cellules du circuit microfluidique.
- 2- Développer un système de virométrie de flux à haute sensibilité qui permettra de détecter chaque virion fluorescent produit par une cellule unique et de quantifier ainsi des particules virales à très faible concentration. Ses performances seront comparées à celles du NTA.
- 3- Coupler les deux systèmes en une seule puce pour étudier en temps réel la dynamique du relargage des particules virales. Le flux continu appliqué amènera toutes les particules relarguées par la cellule piégée jusqu'à la région de détection. La reproductibilité du système sera évaluée à l'aide d'une cellule productrice unique clonée (lignée stable monoclonale).

Cette technique permettra de répondre à des questions simples mais cruciales : quand ? combien ? et à quelle fréquence les virions sont-ils relargués dans le milieu par la cellule hôte ? L'étude permettra également de comparer la dynamique de production virale entre cellules de même type mais aussi entre plusieurs types cellulaires.

Matériels et Méthodes

1. Etablissements des lignées stables productrices des VLP-GFP

Deux lignées stables HeLa et HEK 293 de diamètre $17\pm 5\ \mu\text{m}$ et $13\pm 4\ \mu\text{m}$, respectivement, et productrices de VLP-GFP et non infectieuses sont établies selon la procédure suivante : les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) complémenté avec du sérum du veau fœtal à 10%, à 37°C et 5% CO₂. Elles sont transfectées par un plasmide exprimant la protéine Gag du VIH-1 fusionnée à la GFP et un gène de résistance à la néomycine, en utilisant l'agent transfectant JetPei (Polyplus). Ensuite, elles sont soumises à une sélection par l'antibiotique Généticine (G418) pendant deux semaines pour être, par la suite, triées au FACS (Fluorescence-activated cell sorting). Cette technique a permis de sélectionner les cellules qui ont intégré le plasmide et donc celles qui sont productrices des VLP-GFP. Les cellules HEK 293 sont mises en culture et constituent la lignée polyclonale dont la production virale sera analysée à partir d'une population de quelques millions de cellules et aussi à l'échelle de la cellule unique. Par contre, pour les cellules HeLa une lignée monoclonale a été établie en réalisant une série de dilutions pour isoler une cellule unique. Celle-ci est cultivée dans du milieu spécial, qu'on nomme *milieu conditionné* et qui est obtenu à partir du surnageant de cellules HeLa non productrices dilué deux fois avec du milieu frais. Ce *milieu conditionné* contient des facteurs de croissance, des métabolites et des protéines de la matrice extracellulaire permettant de mimer l'environnement d'une population de cellules. L'établissement des lignées cellulaires est représenté dans la **Figure 24**.

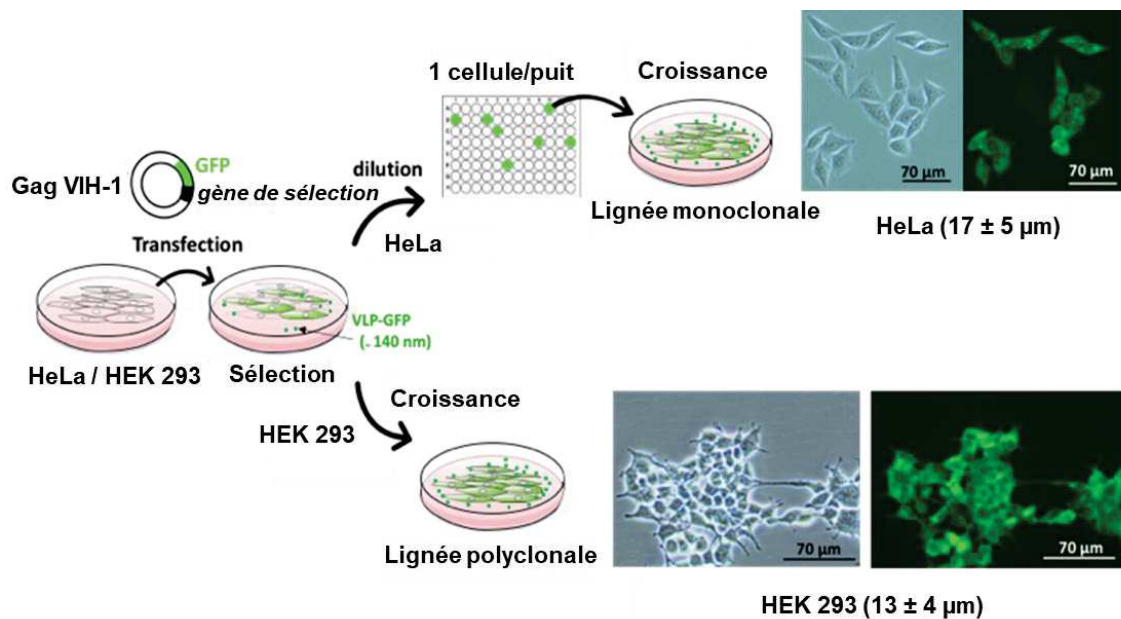


Figure 24: Représentation schématique de l'établissement des lignées cellulaires productrices des VLP-GFP

Après la transfection des deux types cellulaires HeLa et HEK 293 par le plasmide exprimant Gag-GFP, la sélection est effectuée par l'ajout de la néomycine dans le milieu de culture. Les cellules HEK 293 transfectées sont mises en culture pour l'établissement de la population polyclonale. Pour les cellules HeLa une étape additionnelle est effectuée. Elle consiste à isoler une cellule unique et à la maintenir en culture pour obtenir une lignée monoclonale. L'observation microscopique est effectuée avec un objectif 20x en lumière blanche (photo à gauche) et en fluorescence (photo à droite).

2. Préparation du stock viral à partir de populations de cellules

Les stocks de virions sont préparés en collectant les surnageants des deux types cellulaires HeLa et HEK 293 productrices des VLP-GFP cultivées jusqu'à une confluence de 40-60% dans des boîtes de culture de 10 cm. Après 5h ou 48h, les surnageants sont récupérés après avoir lavé plusieurs fois les cellules adhérentes, avec le même milieu, pour détacher toutes les particules virales pouvant toujours être accrochées à la surface des cellules ou à la surface du plastique. Les récoltes de 48h sont effectuées pour la préparation d'une production virale plus importante (en vue d'être analysée par NTA). Ensuite, les surnageants sont filtrés à 0.45 µm pour enlever les débris cellulaires et les éventuelles cellules. Les échantillons sont soit directement aliquotés et stockés à -80°C pour être analysés par virométrie, soit concentrés par ultracentrifugation pour les analyser en NTA. L'ultracentrifugation est effectuée sur un coussin de sucrose 20% à 30 000 rpm et à 4°C pendant 1h30. Le culot des

nanoparticules (VLPs et EV) est resuspendu dans 100µl du PBS, aliquoté et stocké à -80°C (**Figure 25**). Pour étudier le taux de VLPs / cellule / h, des photos ont été prises en lumière blanche et en filtre GFP afin de déduire le pourcentage de cellules productrices de VLPs fluorescents (cellules vertes). Ensuite, le nombre total des cellules a été défini avec la cellule de Malassez.

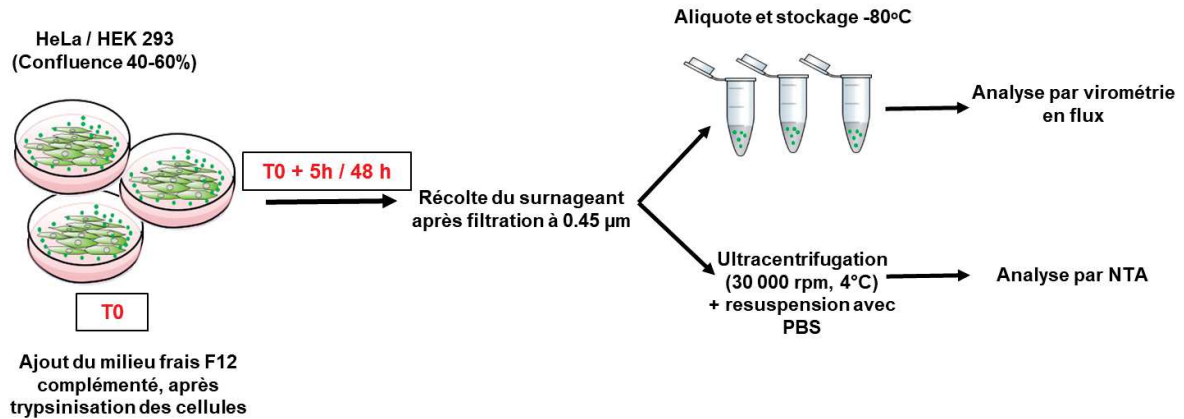


Figure 25: Représentation schématique de la préparation du stock viral à partir de population de cellules

A partir des boîtes de culture (diamètre = 10cm) avec 40-60% de confluence cellulaire, les cellules sont trypsinisées et le surnageant est remplacé par du milieu frais à T0. Après 5h et 48h, les cellules sont lavées avec le même surnageant pour récupérer l'excès de virions pouvant être accrochés aux cellules. Ensuite, le surnageant est filtré à 0,45 µm puis aliquoté et stocké à -80°C pour l'analyse par virométrie en flux. Pour le NTA, le surnageant est concentré par ultracentrifugation et le culot des nanoparticules est resuspendu avec du PBS puis stocké à - 80°C.

3. NTA

Les expériences de NTA ont été effectuées avec l'appareil Nanosight NS300 (Malvern) qui est équipée d'une caméra sCMOS et d'un laser à 488 nm (**Figure 26**). Cette technique permet de visualiser et d'analyser des particules en suspension avec des tailles entre 10 nm et 1000 nm. Elle relie le mouvement brownien des nanoparticules à leur taille suivant l'équation de Stokes-Einstein citée ci-dessous (pour $n = 2$, nombre de degré de liberté). Ainsi, elle permet de déterminer en plus de la concentration de particules (fluorescentes et non-fluorescentes) le profil de distribution de taille des particules.

$$\overline{(x, y)^2} = 2 \cdot K_b \cdot \frac{T}{3\pi r \mu} * \Delta t$$

Où, $\overline{(x, y)^2}$ = déplacement quadratique moyenne d'une particule au carré (m^2)

K_b = constante de Boltzmann ($1.4 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

T = température (K)

r = rayon hydrodynamique de la particule (m)

η = viscosité dynamique du liquide (Pa.s)

t = temps

Un pousse-seringue est utilisée pour introduire l'échantillon dans une chambre microfluidique de 50 μm de hauteur et de 1 mm de largeur. Le flux est constant lors de la capture des vidéos. Un débit de 26 $\mu\text{l/min}$ est ajusté afin de visualiser 10-100 particules / image pour s'assurer d'une statistique fiable. Les nanoparticules illuminées par le laser traversent la chambre et sont transportées par le fluide en subissant en même temps un mouvement brownien et diffusent la lumière en fonction de leur taille. La diffusion de la lumière par les différentes nanoparticules est capturée sur plusieurs images ce qui permet de suivre image par image le mouvement de chaque particule en utilisant le logiciel NTA 2.0. Pour chaque échantillon, trois vidéos de 60s chacune sont prises à 25°C avec le niveau de la caméra fixé au maximum (16 u.a.). La température doit être stable durant la capture sinon les courants de convection dans l'échantillon peuvent causer des mouvements aléatoires et donc une estimation erronée de la concentration. L'appareil est calibré en utilisant des billes fluorescentes de 100 nm (TetraSpek, $1,8 \times 10^{13}$ particules/ml).

Cette technique présente le grand avantage de définir le rapport entre la production des VLP-GFP et des EVs. En effet, la lumière diffusée nous donne la concentration de toutes les nanoparticules présentes dans l'échantillon. A partir des concentrations obtenues par la lumière diffusée (LD) et celles obtenues quand le filtre de fluorescence (488 nm) est utilisé, on pourra ainsi déduire si la production virale affecte ou pas la production des EVs.

NanoSight – NS300

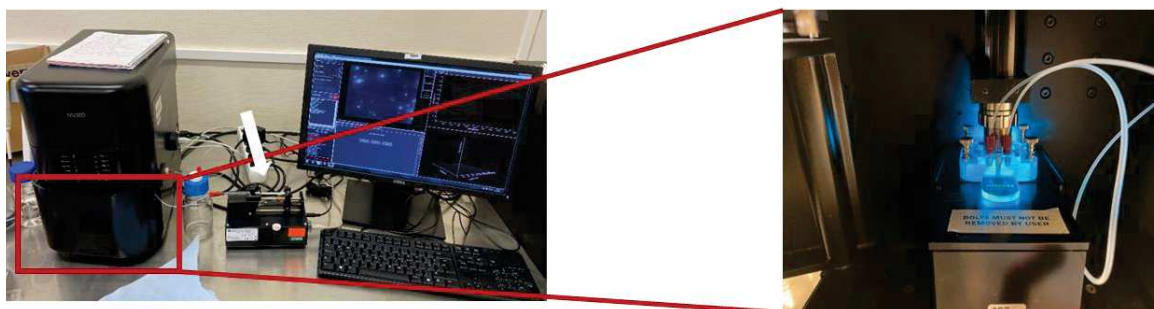


Figure 26: Montage expérimental des expériences du NTA

Photos de l'appareil NanoSight – NS300 (Malvern) équipé d'une camera sCMOS et du laser 488 nm. Un pousse seringue (flèche blanche) est utilisé pour introduire l'échantillon dans la chambre microfluidique d'analyse. Le logiciel NTA 2.0. est utilisé pour l'analyse des vidéos et l'établissement de la concentration et du profil de distribution de tailles. La photo à droite montre la chambre d'analyse fixée au-dessus du faisceau laser 488 nm par quatre vis. Les tubes d'entrée et de sortie sont introduits dans la chambre. L'illumination bleue représente l'excitation du laser une fois que la caméra est mise en mode capture.

4. Fabrication des puces microfluidiques

La conception de puces microfluidiques représente le cœur du projet envisagé par Dr. M. Mougel en 2016 sur « L'étude en temps réel de la cinétique de libération de virus à l'échelle de la cellule unique ». Ceci a débuté par des puces de capture de cellules uniques (**Figure 27A**) et d'autres puces pour détecter des nanoparticules fluorescentes (**Figure 27B**), pour arriver en début de 2018 avec la conception de la puce couplée de première génération (**Figure 27C**). Celle-ci a été améliorée fin 2019 (puce couplée 2ème génération), suite à l'idée proposée par Dr. M. Mougel de changer l'orientation du canal contenant le piège et la partie de détection de nanoparticules. Cette puce contient 10 canaux contenant des pièges et des canaux de détection individuelle, perpendiculaires au canal principal (**Figure 27D**).

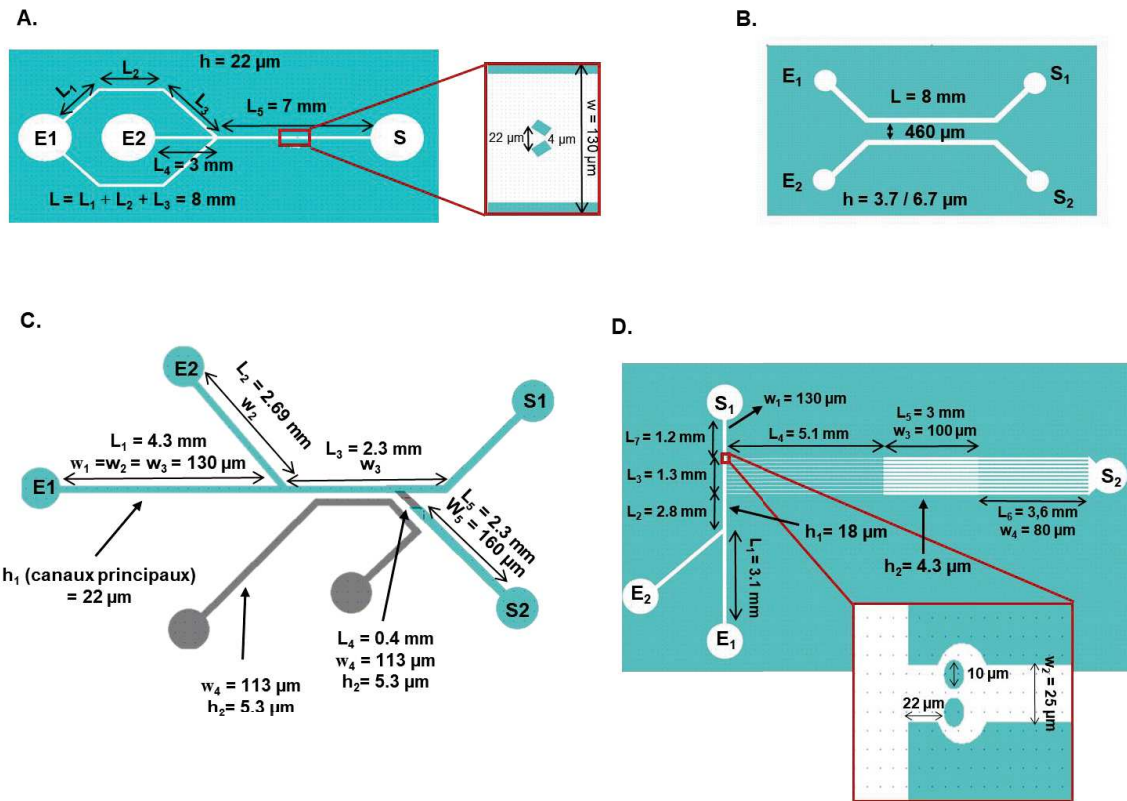


Figure 27: Les dessins Clewin des différentes générations de puces

Quatre générations de puces ont été conçues et manipulées. **A.** La puce de capture comporte un piège et permet l'immobilisation d'une cellule unique sous flux continu ($h = 22 \mu\text{m}$). **B.** La puce de détection est constituée de deux canaux parallèles et permet la quantification des virions à partir de surnageants de population de cellules ($h = 3,7 / 6,7 \mu\text{m}$). **C.** La première génération de puce couplée est constituée d'un piège et d'un seul canal de détection permettant l'étude en temps réel de la dynamique du relargage viral d'une cellule unique. Les deux couleurs représentent deux masques de hauteurs différentes ($h_1 = 22 \mu\text{m} / h_2 = 5,3 \mu\text{m}$). **D.** La puce couplée multiplex comporte dix canaux constitués chacun d'un piège et d'un canal de détection ($h_1 = 18 \mu\text{m} / h_2 = 4,3 \mu\text{m}$). Elle permet l'étude de la dynamique de la libération virale de maximum 2 cellules simultanément. Les dimensions des différentes puces ainsi que leurs entrées et sorties sont indiquées sur le schéma. L'agrandissement dans les photos A et D représente le piège caractéristique de chaque puce avec ses dimensions.

Les différentes puces ont été dessinées sur le logiciel *Clewin* (**Figure 27**), en apportant ma contribution pour le dessin de la puce de détection et la puce couplée 1^{ère} génération dès mon entrée en thèse, fabriquées en salle blanche par photolithographie (résumé de la technique dans la **Figure 28**) et manipulées à l'IRIM.

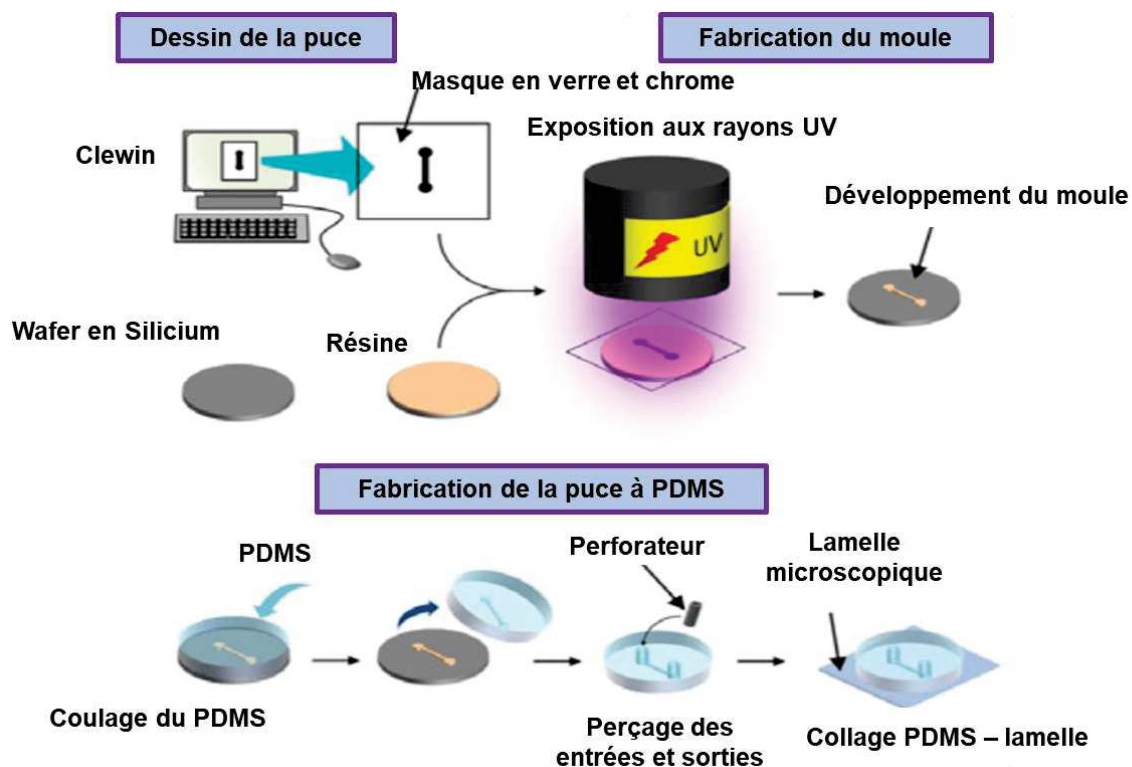


Figure 28: La microfabrication des puces par la technique standard de photolithographie

La photolithographie consiste en trois étapes : le dessin de la puce, la fabrication du moule suivie par la fabrication de la puce en PDMS. Le dessin *Clewain* est transposé sur un masque en verre et chrome. Une couche de résine négative SU-8 est déposée sur un wafer en silicone et exposée aux rayonnements UV à travers le masque. Ensuite, une étape de cuisson est effectuée qui est suivie d'un développement. Puis, les puces sont préparées par le coulage du PDMS sur le moule une fois il est mélangé avec son réticulant et dégazé. Après polymérisation, les puces sont découpées et percées pour former les puits (des entrées et des sorties). Les bouts du PDMS ainsi que les lamelles sont traités au plasma oxygène et collés.

Avant de tester la puce couplée de 1^{ère} génération, les puces de capture et de détection ont été testées séparément. Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de manipuler les deux générations de puces couplées dont la deuxième m'a permis d'obtenir des résultats sur la cinétique de la libération de VLPs de cellules uniques.

Toutes les puces que j'ai manipulées durant ma thèse ont été fabriquées en salle blanche par photolithographie avec l'assistance de Dr. Benoit Charlot et Dr. Marius Socol. Le dessin *Clewain* de chaque puce est transposé sur un masque en verre et chrome au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) à

Toulouse. De la résine photorésistante négative SU-8 est déposée sur un wafer en silicone de 7.6 cm de diamètre. Celui-ci est ensuite tourné à une vitesse calibrée pour la formation d'une couche uniforme avec une hauteur connue. Ceci est suivi par une étape de cuisson qui assure l'élimination d'une partie des solvants et la polymérisation de la matrice. Puis, la résine est exposée aux rayonnements ultraviolets à travers le masque. Leur interaction avec le sel présent dans la résine induit la formation d'un acide qui protonise les groupements époxydes dans les monomères de la résine les rendant ainsi actifs. A cette étape et malgré l'activation des monomères, la polymérisation n'aura pas lieu qu'avec l'augmentation de la température. Pour se faire, l'insolation est suivie par une étape de cuisson durant laquelle les monomères se croisent. Ceci rend la résine stable et résistante aux produits chimiques et aux endommagements provoqués par les radiations, d'où sa photorésistance. Enfin la résine est développée afin de solubiliser la partie non exposée aux UV et de mettre en relief les motifs. Pour la puce couplée, une gravure ionique pour 2 min est faite en utilisant le plasma (un mélange de CHF_3 et O_2) entre le dépôt des deux couches de résine. La gravure de 100 nm permet la visualisation de la première couche de résine et par la suite elle facilite l'alignement. La hauteur de la résine déposée sur le wafer est mesurée par un profilomètre.

Une fois le moule prêt, les puces microfluidiques sont faites par du PDMS (Polydiméthylsiloxane). Un mélange de PDMS (Sylgard 184) avec 10% de son agent réticulant est préparé, dégazé et versé sur le wafer. Celui-ci est mis dans l'étuve 2h à 70°C afin qu'il polymérise. Après polymérisation, les puces sont découpées et percées à l'aide d'un perforateur de 1,2 mm de diamètre. Ensuite, elles sont nettoyées à l'isopropanol, traitées au plasma oxygène et collées sur des lamelles de verre nettoyées au préalable. Le plasma oxygène crée des groupements OH aux surfaces du PDMS et des lamelles. Les puces sont mises sur plaque chauffante à 70°C pour induire l'évaporation des molécules d'eau et assurer un bon collage.

5. Opération des puces

Les expériences de microscopie ont été effectuées à la plateforme MRI en utilisant le microscope Nikon Ti2 inversé champ plein à épifluorescence (doté du logiciel Nikon Imaging Software – NIS) qui est équipé d'une caméra CMOS back-illuminated Prime95B (1200*1200 pixels avec taille d'un pixel = 11µm). Il est équipé d'une cage

thermostatée sous CO₂. Pendant les expériences, la température est fixée à 37°C et le CO₂ à 5%.

Les pressions appliquées au niveau des différentes entrées et sorties des puces sont contrôlées par un contrôleur de pression (Fluigent) qui présente quatre voies : trois voies avec $P_{\max}=69$ mbar et la quatrième voie avec $P_{\max}=2$ bar. Pour un contrôle du flux plus efficace au niveau des différentes régions des puces, des robinets externes sont utilisés. Ceux-ci sont fixés sur une boîte contenant les tubes de perfusion et d'ensemencement qui sont eux-mêmes connectés au contrôleur de pression à l'aide des tubes flexibles (**Figure 29**).

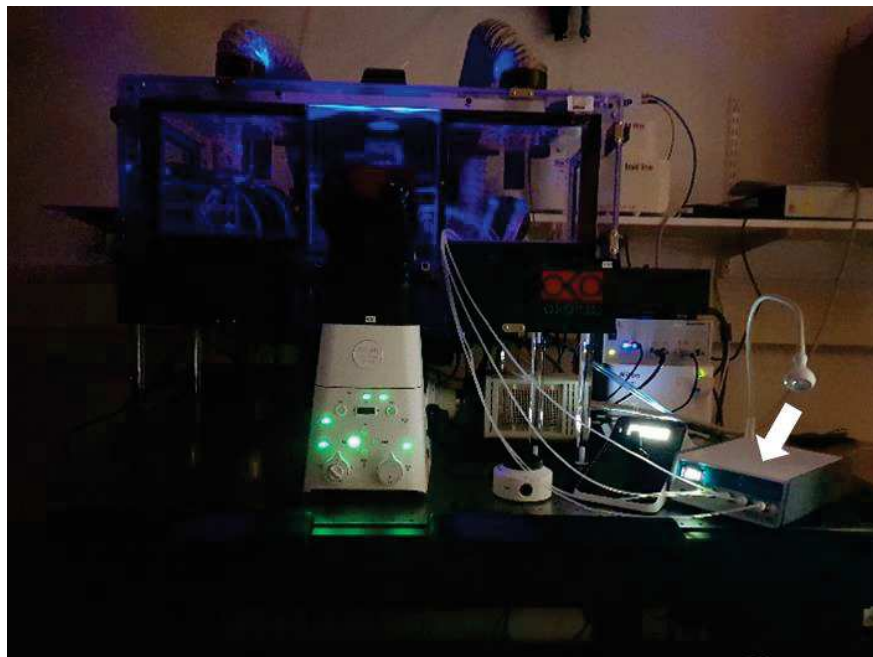


Figure 29: Le montage expérimental des expériences de vidéomicroscopie à la plateforme MRI

Toutes les expériences de vidéomicroscopie sont faites avec un microscope Nikon Ti2 inversé champ plein à épifluorescence équipé d'une caméra CMOS. Les puces sont fixées sur un statif dans une chambre thermostatée à 37°C et CO₂ à 5%. Un contrôleur de pression (Fluigent) à quatre voies (flèche blanche) est utilisé et connecté aux puces par l'intermédiaire des tubes flexibles. L'illumination bleue représente l'excitation du laser $\lambda=470$ nm pour la visualisation des VLP-GFP.

6. Microscopie

Deux objectifs 20x et 40x à air ayant une ouverture numérique NA= 0,75 sont utilisés pendant toutes les expériences. L'objectif 20x a été utilisé pour la prise des photos des cellules piégées alors que l'objectif 40x est utilisé pour la quantification des nanoparticules. La détection des virions est effectuée avec un temps d'exposition 150ms, binning 2x2 et 100% d'intensité d'illumination. Le pixel sur l'image est égal à $11 \mu m \times \frac{2}{40} = 0,55 \mu m$. Pour l'objectif 40x, la profondeur de champ est à 1,44 μm . Les vidéos sont analysées manuellement en utilisant le logiciel Fiji. La méthode d'analyse dans chaque type de puce sera détaillée dans la partie Résultats.

Résultats

1. Capture de cellules uniques et étude des contraintes de cisaillement

Afin de piéger une cellule unique, une puce de capture ($h=22\text{ }\mu\text{m}$) a été conçue avec deux entrées E1 et E2, une sortie S et un piège. Trois formes de piège ont été testés (Figure 30) :

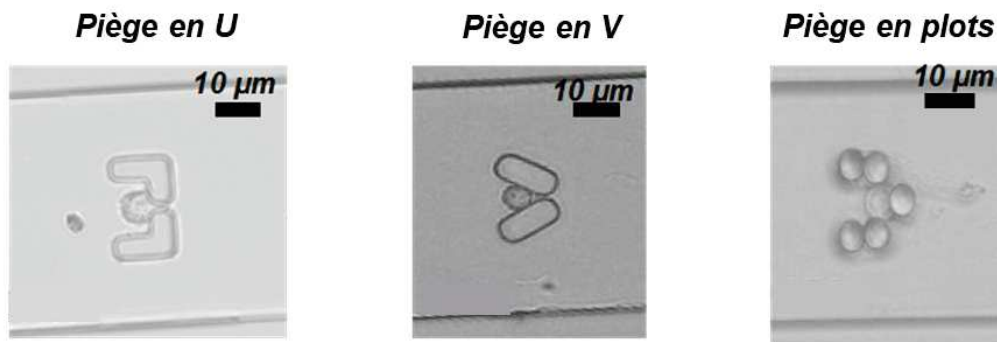


Figure 30: Représentation des trois formes du piège dans la puce de capture.

Chaque piège est occupé par une cellule unique. L'observation est effectuée avec l'objectif 10x.

Le piège en U présente une surface de contact avec la cellule plus grande que celle avec le piège V, ce qui exerce des contraintes de cisaillement plus importantes sur la cellule. Pour le piège en plots, en dépit de la faible surface de contact avec la cellule, celui-ci n'a pas été retenu car les cinq plots du piège n'étaient pas toujours bien développés après l'insolation de la résine par les rayons UV. Au final, c'est le piège en V qui a été choisi car sa microfabrication est simple et que la surface de contact avec la cellule est minime.

Les étapes de capture sont représentées dans la **Figure 31**. Juste avant usage, la puce est traitée au plasma oxygène pour rendre sa surface hydrophile et éviter toute adhérence cellulaire. La première étape consiste à mouiller la puce au niveau E1 avec du milieu conditionné pendant 1h avec une pression $P = 0,5\text{ mbar}$. Pendant le mouillage, des cellules HeLa productrices de VIH-1 Gag-GFP VLPs sont trypsinisées, récupérées dans du milieu F12 complété (10% de sérum) et ajustées à une concentration de $\sim 10^5$ cellules/ml qui permet une capture rapide de cellules uniques (5min suivant l'introduction des cellules dans la puce). Cette performance n'est pas assurée par des concentrations différentes : les solutions diluées ($< 10^4$ cellules/ml)

nécessitent une durée plus longue pour emprisonner une cellule dans le piège et celles concentrées ($>10^5$ cellules/ml) induisent une agglomération des cellules et rendent difficile la capture de cellules uniques. Le mouillage est suivi par l'introduction des cellules au niveau E2 en appliquant une pression $P1 = 0,5$ mbar, après avoir bloqué E1 par la fermeture du robinet externe. Ceci permet d'éviter une contamination qui peut être causée par un reflux de E2 vers E1. Une pression $P3 = 0$ mbar est appliquée au niveau S. Du moment où une cellule occupe le piège, le robinet au niveau E1 est ouvert en appliquant au préalable une pression $P > P1$. Ensuite, $P1$ est réduite jusqu'à 0 tout en maintenant le robinet ouvert. La viabilité de la cellule est surveillée en ajoutant un marqueur de viabilité, l'iodure de propidium (IP) à une concentration finale $2 \mu\text{g/ml}$ dans le milieu. Il s'agit d'un agent fluorescent intercalant qui rentre dans les cellules mortes qui ont perdu leur intégrité membranaire et marque le noyau. Ainsi, une cellule IP négative est une cellule vivante.

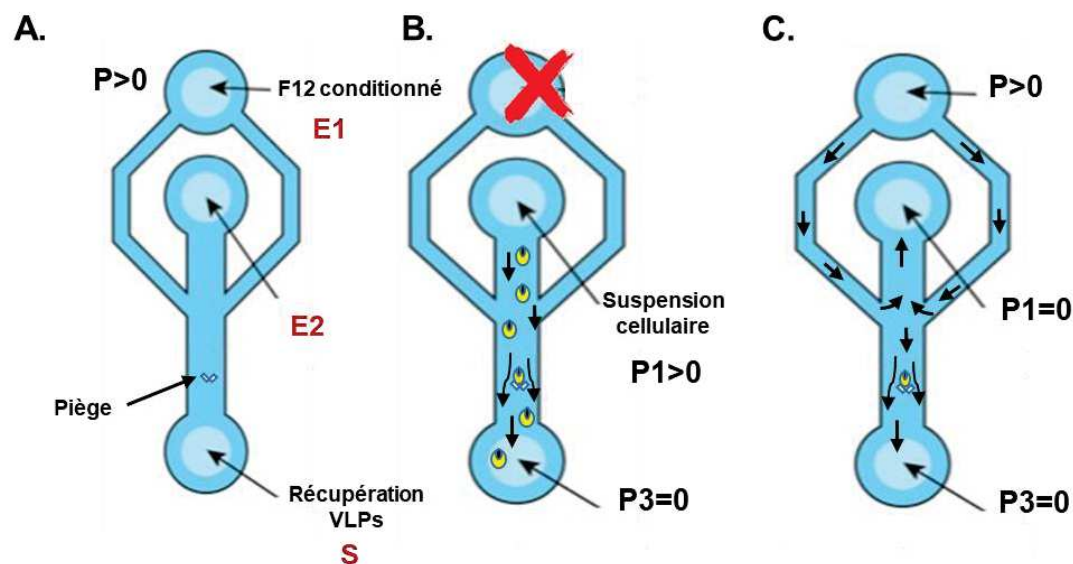


Figure 31: Fonctionnement de la puce de capture.

A. Mouillage de la puce au niveau de E1 avec du milieu conditionné. **B.** Introduction des cellules au niveau E2 avec $P1 > 0$ après avoir bloqué E1 en fermant son robinet externe. La pression $P3$ appliquée au niveau S est nulle pour assurer le flux vers la sortie. **C.** Après la capture d'une cellule unique, le robinet au niveau E1 est ouvert en appliquant au préalable une pression $P > 0$. Une pression nulle $P1$ est appliquée au niveau E2. Le flux créé de E1 vers S assure l'alimentation de la cellule par le milieu de culture, et le reflux de E1 vers E2 prévient toute contamination pouvant provenir de la suspension cellulaire. La récupération du milieu contenant les VLP s'effectue après l'élimination du milieu qui avait écoulé dans l'intervalle de temps qui précède la capture.

Après avoir piégée une cellule unique (**Figure 32**), deux conditions principales doivent être assurées : un reflux continu de E1 vers E2 pour éviter toute contamination avec de nouvelles cellules et de VLPs provenant des cellules en E2, et un minimum de contraintes de cisaillement (comparables à celles subies par les globules rouges dans un capillaire : 0,8 Pa (Dupire et al., 2012a)) pour maintenir la cellule vivante. Ces deux facteurs sont déterminés par les vitesses dans chaque sous-région du circuit microfluidique qui seront calculées selon les systèmes d'équation ci-dessous.

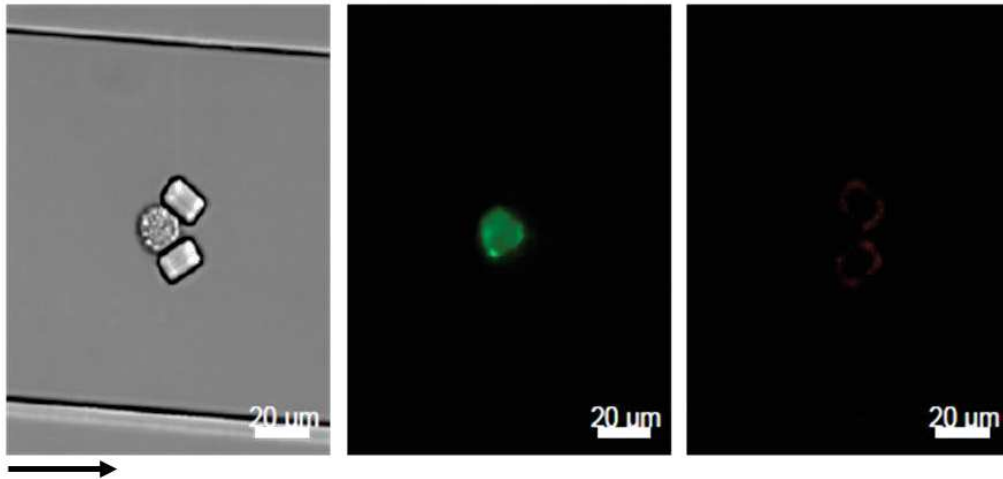


Figure 32: Cellule piégée (piège en V) dans la puce de capture.

Une cellule unique productrice de VLP-GFP est piégée dans une puce de capture. Les trois photos représentent la cellule en lumière blanche (à gauche), en fluorescence GFP (au milieu, λ excitation= 470 nm, Texp 150ms, Intensité I: 15%) et avec de l'iodure de propidium IP dans le milieu conditionné (à droite, λ excitation= 538 nm, Texp 60ms, I: 10%). La cellule est maintenue vivante durant toute l'expérience qui a duré 3h. L'observation est effectuée avec l'objectif 20x, un ROI délimite en x le piège et en y les deux parois du microcanal. La flèche noire montre le sens du flux.

Puisqu'il s'agit d'un fluide newtonien non compressible dans un écoulement laminaire, le flux entraîné par la pression est un écoulement de type Poiseuille dont les caractéristiques sont étudiées dans le chapitre 2 de l'introduction. La répartition du flux dans un microcanal rectangulaire est présentée dans la **Figure 33A**. Lorsque $h \ll w$ et L , la relation entre le débit (Q), la différence de pression appliquée aux deux extrémités du microcanal (ΔP) et la surface du canal (S) est donnée par la formule suivante :

$$Q = v * S = v * h * w = \frac{\Delta P * h^3 * w}{12\mu L}$$

Avec v la vitesse moyenne qui est égale au $2/3$ de la vitesse maximale. h , w et L représentent la hauteur, la largeur et la longueur du microcanal, respectivement. μ représente la viscosité dynamique du fluide.

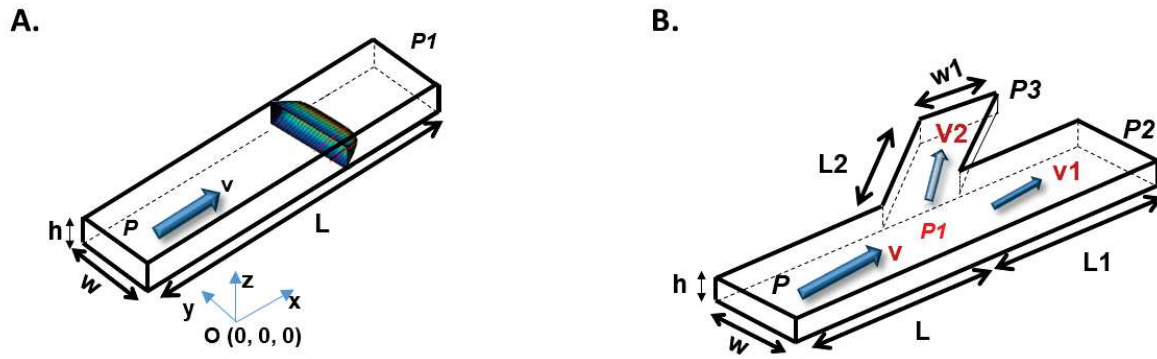


Figure 33: Représentation de la répartition du flux dans un microcanal rectangulaire ayant un rapport d'aspect arbitraire h/w

A. Le flux est créé par une différence de pression $P-P1$ appliquée au niveau des deux extrémités du canal rectangulaire ayant une hauteur h , une longueur L et une largeur w . v représente la vitesse moyenne du flux le long du microcanal et le profil parabolique de la distribution de la vitesse est donné par une simulation COMSOL. **B.** En cas d'une bifurcation, le flux se répartit entre les différentes sections du canal dont les dimensions et les vitesses moyennes sont indiquées sur la figure. Les pressions P , $P2$ et $P3$ représentent les pressions externes appliquées. $P1$ représente la pression interne présente au niveau de la ramification.

En présence de bifurcations, le débit sera distribué dans les différentes sections du système (**Figure 33B**). Dans le cas de notre puce de capture, à l'entrée du microcanal le débit du flux Q se divise en $Q1$ (côté haut) et $Q2$ (côté bas) pour se répartir ensuite en $Q3$ (côté S) et $Q4$ (côté E2). En appliquant la loi de la conservation du débit, on établit le système d'équations ci-dessous. Les annotations des pressions et des vitesses sont représentées dans la **Figure 34**.

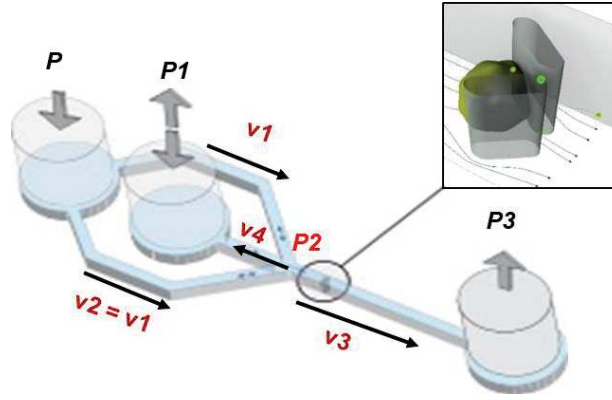


Figure 34: Représentation schématique des vitesses et des pressions dans la puce de capture ($h = 22\mu\text{m}$)

Les différentes pressions (P , $P1$, $P2$ et $P3$) ainsi que les vitesses moyennes du flux dans les différentes sections de la puce sont représentées. L'agrandissement montre un piège occupé par une cellule productrice de VLP-GFP.

Vu que $Q1 = Q2$ (même distance parcourue par le liquide) et $Q1 + Q2 = Q3 + Q4$. On obtient le système suivant :

$$\begin{cases} 2 * v1 = v3 + v4 \\ v1 = \frac{k*(P-P2)}{L} \\ v3 = \frac{k*(P2-P3)}{L5} \\ v4 = \frac{k*(P2-P1)}{L4} \end{cases} \quad (S1) \quad \text{avec } k = \frac{\delta * h^2}{12 * \mu}$$

δ est une constante qui dépend du ratio h/w caractérisant le microcanal (Bruus, 2007).

Pour la puce de capture ayant $h = 22\mu\text{m}$, $\delta = 0,9$.

$$\text{Ainsi, } K = \frac{0,9 * (22 * 10^{-3})^2}{12 * 10^{-3}} * 10^5 = 3,63.10^3 \text{ mm}^2 / \text{Pa.s}$$

Etant donné qu'on applique une pression nulle au niveau de la sortie ($P3 = 0$), la solution de S1 permet d'exprimer la pression $P2$ en fonction de P et $P1$:

$$P2 = \frac{21P + 28P1}{61}$$

Si on remplace l'équation de $P2$ dans S1, on établit les équations des vitesses $v1$, $v3$ et $v4$ en fonction de P et $P1$:

$$\begin{cases} v1 = k * \frac{10P - 7P1}{122} \\ v3 = k * \frac{3P + 4P1}{61} \\ v4 = k * \frac{7P - 11P1}{61} \end{cases}$$

Pour une pression $P = 3$ mbar appliquée au niveau de E1, les vitesses $v1$, $v3$ et $v4$ varient en fonction de $P1$ (**Figure 35**). Le reflux continu vers E2 s'explique par une vitesse $v4$ positive qui s'obtient, selon le graphe, pour une pression $P1 < 2$ mbar.

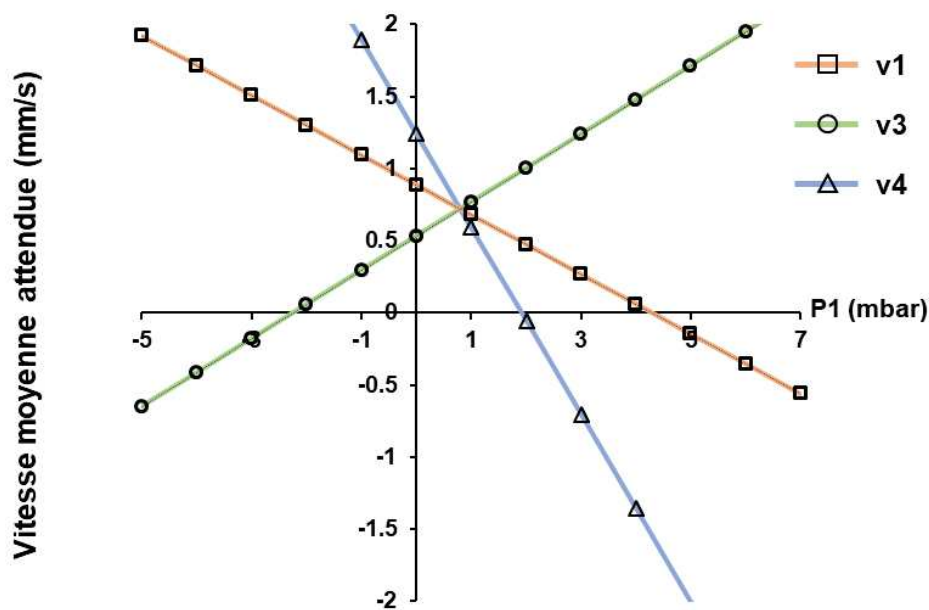


Figure 35: Graphe montrant les variations des vitesses moyennes dans les différentes sections de la puce de capture en fonction de la pression $P1$

Pour une pression $P = 3$ mbar et $P3 = 0$ mbar, les vitesses $v1$ (en orange), $v3$ (en vert) et $v4$ (en bleu) sont représentées en fonction de la pression $P1$.

La deuxième condition concerne les contraintes de cisaillement qui sont subies par la cellule piégée et qui sont fonction de la vitesse du flux traversant celle-ci. Des simulations COMSOL sont effectuées par M.Socol et A.Naillon afin d'évaluer la variation de la vitesse des lignes de flux, donc le taux de cisaillement (s^{-1}), sur toute la hauteur du microcanal en utilisant une bille de taille de $17 \mu m$ afin de mimer la présence d'une cellule HeLa au niveau du piège. Pour une pression $P = 3$ mbar et $P1 = P3 = 0$ mbar, la vitesse du flux atteint son maximum ($1400 \mu m/s$) à $\sim 17 \mu m$ à

proximité des plots du piège (**Figure 36A**). Dans la section du microcanal où le piège est placé, la vitesse moyenne v_3 est égale à 500 $\mu\text{m/s}$. Au niveau de la cellule, le taux de cisaillement (δ) résultant atteint son maximum au milieu du piège avec une valeur 250 s^{-1} (**Figure 36B**). Ceci nous permet de calculer les contraintes de cisaillement maximales (σ_{max}) en multipliant δ_{max} avec la viscosité dynamique du fluide (10^{-3} Pa.s). Le résultat obtenu (0.25 Pa) est comparable aux contraintes de cisaillement étudiées sur les cellules endothéliales dans les capillaires sanguins et qui sont de l'ordre de 0,72 Pa (Dupire et al., 2012a). Expérimentalement, les contraintes de cisaillement sont évaluées par l'étude de la déformation de la cellule en fonction de la pression P avec $P_1 = P_3 = 0 \text{ mbar}$. Après la capture d'une cellule unique, P est incrémentée de 10 en 10 mbar, et des vidéos de 15 min sont prises pour chaque valeur de pression et le comportement cellulaire est noté. Ainsi, pour $P < 10 \text{ mbar}$ la cellule maintient toujours sa morphologie arrondie, par contre pour une pression $P > 20 \text{ mbar}$ on observe une déformation cellulaire due aux contraintes de cisaillement (**Figure 36C**). Ceci démontre que l'intégrité cellulaire sous un flux continu pourrait être assurée pour des pressions inférieures à 10 mbar.

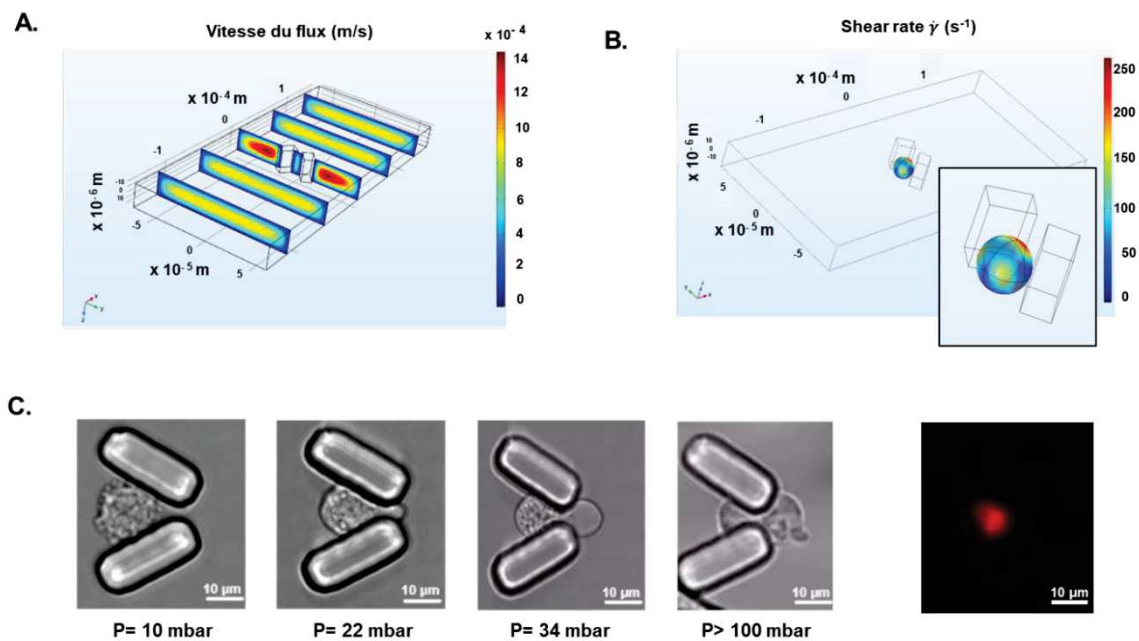


Figure 36: Etude des contraintes de cisaillement subies par une cellule piégée en puce de capture

A. et B. Simulations COMSOL de la variation de la vitesse du flux au voisinage d'un piège (à gauche) en l'absence de cellule et du taux de cisaillement induit à proximité de la surface d'une bille de $17\ \mu\text{m}$ dans le piège (à droite) en appliquant les pressions $P= 3\text{ mbar}$ et $P1 = P3 = 0\text{ mbar}$. **C.** Etude expérimentale de l'effet des contraintes de cisaillement que la cellule piégée subit en fonction de la pression P du milieu appliquée au niveau E1. Avec $P < 20\text{ mbar}$, la cellule maintient sa morphologie pour se déformer à partir de 20 mbar et s'échapper du piège pour $P > 100\text{ mbar}$. La figure à droite montre une cellule morte coloré en rouge (IP+) (Texp 60ms, I: 10%).

2. Etude de la production virale à partir de populations de cellules

2.1. Virométrie en flux

Afin de quantifier la production virale d'une population de cellules, nous avons développé un système très simple de virométrie en flux à l'aide d'une puce de détection ». Pour que la quantification soit précise, il faut être capable de détecter chaque virion qui traverse le canal d'analyse. Ceux-ci ne doivent pas passer trop vite et notre microscope doit détecter les virions sur toute la hauteur du canal, afin qu'aucune particule virale n'échappe à la détection. C'est pourquoi la puce est constituée de deux microcanaux identiques en parallèle de hauteurs de quelques μm , présentant chacun une entrée et une sortie. Le premier canal sert de référence et nous permet d'effectuer la mise au point (focus à mi-hauteur du canal) pour la détection des nanoparticules en utilisant des billes fluorescentes de diamètre 100 nm. Le deuxième canal sert à la mesure. Deux hauteurs de puces (3,7 et 6,7 μm) ont été testées.

Plusieurs millions de cellules sont mises en culture (boîte de 10cm) et les virions produits et relargués dans le milieu de culture sont collectés après 5h ou 48h de culture afin de déterminer la production virale de cette population de cellule.

La puce de détection est manipulée selon la procédure suivante : le canal d'analyse est traité au plasma oxygène pour éviter l'adhérence des virions, mais pas le canal de référence (fermé en appliquant un scotch). Ensuite, la puce est mouillée avec du milieu F12 conditionné (+ sérum) puis on introduit les billes fluorescentes dans le canal de référence, et l'échantillon des VLP-GFP dans le deuxième canal (**Figure 37**). Lors de l'observation sous microscope, la mise au point est effectuée en se basant sur le canal de référence. On se focalise au niveau $z = h/2$ en se repérant à la surface du PDMS et sur la lamelle de verre où on détecte les billes qui adhèrent. Ainsi, la raison pour laquelle le canal de référence n'est pas traité au plasma oxygène est pour favoriser l'adhérence des billes. La différence de pression ΔP ($P-P_1$) exercée entre l'entrée et la sortie assure le transport des virions le long du microcanal. Ainsi, la sensibilité de détection est dépendante de ΔP qui définit à son tour la vitesse du

flux. D'où l'importance d'appliquer les bonnes pressions pour assurer une détection de tous les virions.

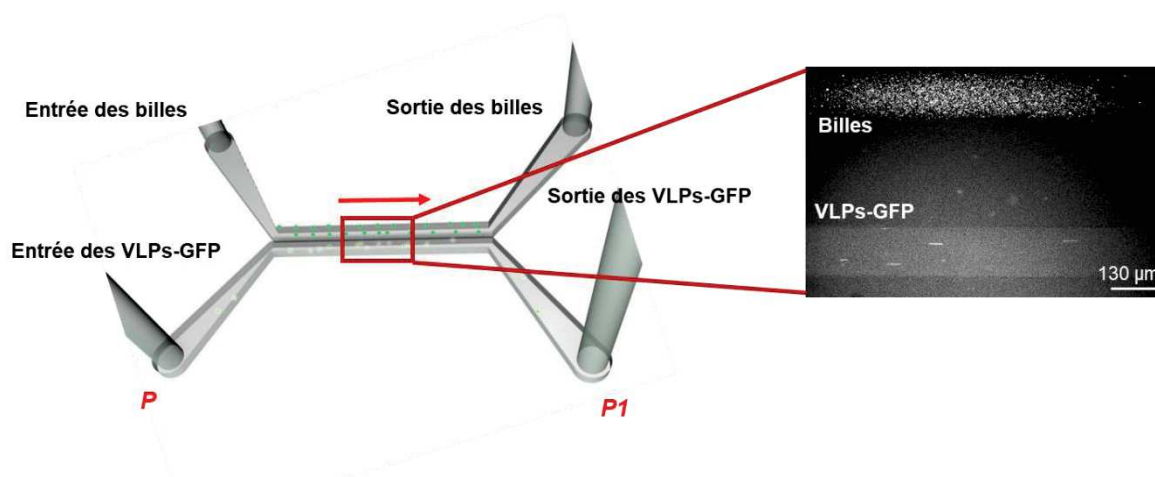


Figure 37: Représentation de la puce de détection.

La puce de détection est constituée de deux canaux identiques: un canal de référence pour la mise au point du microscope en utilisant des billes fluorescentes ($D=100\text{ nm}$) et un canal d'analyse qui permet la quantification des productions virales à partir de surnageants de population de cellules. La flèche rouge dans la figure en 3D indique le sens du flux. L'image à droite est obtenue avec l'objectif 20x et montre les deux canaux remplis respectivement de billes et de virions. Les virions sont transportés en appliquant une différence de pression $\Delta P = P - P1$ aux deux extrémités du canal. Texpo: 150ms, I: 100% avec binning 2.

Le passage des virions dans le microcanal est filmé en continu pendant une durée qui dépend du nombre des VLPs présents dans l'échantillon, avec des films successifs de 1min puis les vidéos sont analysées à l'aide du logiciel Fiji. Les virions N_p sont comptés manuellement image par image dans toutes les vidéos. La vitesse instantanée des particules les plus rapides est calculée par la division de la distance que la particule parcourt entre 2 images par la durée de d'acquisition d'une image. Cette durée est obtenue en divisant le temps d'enregistrement de la vidéo par le nombre d'images. Ensuite, la plus grande valeur obtenue des vitesses instantanées, qui correspond au v_{\max} du fluide, sera utilisée pour calculer la vitesse moyenne en la multipliant par 0,67 (δ équivaut à 1 pour la puce de détection). Ensuite, le débit est calculé en suivant la loi de Hagen-Poiseuille.

La concentration des nanoparticules est déterminée par la formule suivante :

$$C \text{ (particules/ml)} = \frac{Np}{Qx\Delta t}$$

Avec Δt l'intervalle de temps d'analyse (1 min/vidéo). Ainsi, le nombre total des nanoparticules présentes dans le surnageant est obtenu en multipliant C par le volume du surnageant récupéré (~10 ml).

En sachant le nombre total de cellules ainsi que le nombre de cellules productrices (GFP+) et le temps de production, on peut estimer le taux de production virale par cellule unique (nombre de VLP / cellule / h) selon la formule suivante :

$$\text{taux de production virale} = \frac{Cx10}{\text{temps de production} \times \text{nombre de cellules GFP}^+}$$

L'analyse de la production virale à partir des populations HeLa monoclonale et HEK 293 polyclonale a été effectuée en utilisant les puces 6,7 μm et 3,7 μm , respectivement. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2** ci-dessous. Le taux moyen de production virale de ces populations de cellules HEK 293 polyclonale et HeLa monoclonale, exprimé en virions / cellule / h, est égale à 84 ± 21 et 52 ± 8 , respectivement.

Type cellulaire	N° Aliquot	Concentration (virions / ml)	Taux de production (virions / cellule / h)	Moyenne \pm ESM (virions / cellule / h)
HeLa Monoclonale	A1	$1,1 \pm 0,2E+07$	45	52 ± 8
	A2	$4,6 \pm 1,0E+07$	47	
	A3	$8,5 \pm 1,6E+07$	73	
	A4	$6,6 \pm 1,2E+07$	68	
	A5	$6,8 \pm 1,3E+07$	29	
HEK 293 Polyclonale	A1	$1,1 \pm 0,2E+07$	63	84 ± 21
	A2	$1,9 \pm 0,4E+08$	106	

Tableau 2: Quantification par virométrie en flux de la production virale à partir de population de deux types cellulaires

La quantification des virions est effectuée sur cinq productions de cellules HeLa monoclonales et deux productions de cellules HEK 293 polyclonales en puce de 6,7 μm et 3,7 μm , respectivement. Les surnageants analysés proviennent de différentes collectes. La moyenne \pm ESM est calculée pour chaque type cellulaire à partir du taux de production (virions / cellule / h).

Pour avoir une bonne statistique dans la quantification des particules, il nous faut un minimum de trente virions. Pour des concentrations $>10^7$ particules /ml, ce nombre est atteint pour une durée de vidéomicroscopie ne dépassant pas 10 min, par contre plus la solution est diluée, plus il nous faut du temps pour analyser l'échantillon. Ainsi, pour résoudre ce problème nous privilégions la puce de détection d'une hauteur de 6,7 μm . Elle nous permet, en théorie, d'augmenter le débit et donc de réduire le temps de la vidéomicroscopie. Pour évaluer la sensibilité de cette puce, un surnageant de population de cellules HeLa monoclonale est analysé en parallèle avec les deux puces de détection de hauteur 3,7 μm et 6,7 μm en variant la pression P appliquée au niveau de l'entrée du microcanal. Ceci induit une augmentation de la vitesse de flux et donc du débit. La concentration des virions détectés est notée pour chaque vitesse moyenne obtenue. Les résultats sont présentés dans le graphe de la **Figure 38** et montrent que la sensibilité de la détection se réduit et le nombre de virions quantifiés

diminue en dépassant 250 $\mu\text{m/s}$ et 130 $\mu\text{m/s}$ dans les puces 3,7 μm et 6,7 μm , respectivement. Ce résultat montre que la puce de hauteur 3,7 μm est plus sensible que celle de 6,7 μm pour un spectre de vitesses plus large.

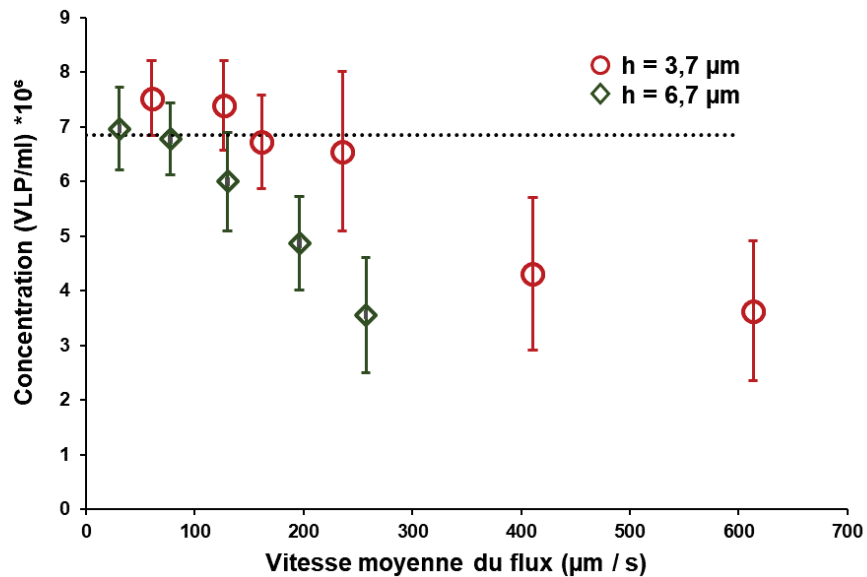


Figure 38: Estimation de la concentration des VLP-GFP en fonction de la vitesse moyenne du flux

Un échantillon de surnageant d'une population de cellules HeLa monoclonale est analysé en parallèle avec les deux puces de détection de hauteurs 3,7 μm et 6,7 μm . La vitesse du flux est variée afin de vérifier si la sensibilité de détection des VLPs fluorescents en dépend. Une baisse de la détection des nanoparticules fluorescents est observée quand la vitesse du fluide augmente. Les vitesses moyennes "limites" du fluide sont de 130 et 300 $\mu\text{m/s}$ pour les deux puces 6,7 μm et 3,7 μm , respectivement. Au-delà de ces deux vitesses, le nombre de virions quantifié diminue, ce qui réduit la sensibilité de la détection. La ligne pointillée représente la moyenne des trois premières concentrations mesurées.

2.2. Comparaison de la virométrie de flux avec le NTA

Afin d'évaluer la robustesse de notre quantification par notre puce de détection, nous avons entrepris une analyse comparative avec le NTA, méthode de référence. Pour se faire, un échantillon de virions a été récupéré à partir de population de cellules HeLa monoclonales et quantifié par les deux techniques. Sa concentration initiale définie par virométrie en flux est de $1,4 \pm 0,1 \times 10^8$ particules/ml et se situe dans les LOD du NTA. L'analyse par NTA révèle une valeur similaire ($1,6 \pm 0,2 \times 10^8$ particules/ml), démontrant ainsi la fiabilité de notre système.

Pour vérifier la linéarité de notre analyse quantitative, une série de dilution de 10 en 10 a été effectuée à partir d'un échantillon dont la concentration est connue et analysée par les deux techniques de quantification. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Solution	Concentration obtenue par virométrie en flux (virions /ml)	Concentration obtenue par NTA (virions / ml)
S0	$1,90 \pm 0,2E+07$	$1,7 \pm 0,1E+07$
S1	$1,7 \pm 0,3E+06$	$1,5 \pm 0,5E+06$
S2	$2,0 \pm 0,4E+05$	$1,2 \pm 1E+06$
S3	$1,4 \pm 0,4E+04$	-

Tableau 3: Quantification d'une production virale de 5h à partir d'une population de cellules HeLa monoclonale par les deux techniques NTA et virométrie en flux (puce de 6,7µm)

Un échantillon de virions dont la concentration initiale S0 est déterminée par virométrie en flux a été dilué 10x (S1), 100x (S2) et 1000x (S3). Chaque solution est ensuite analysée en parallèle par les deux techniques de quantification.

Ces résultats démontrent la fiabilité du système de virométrie en flux. En effet, les valeurs obtenues pour la solution S0 sont similaires avec les deux techniques ($\sim 1,8 \pm 0,2 \times 10^7$ particules/ml). Par contre, pour des solutions de concentration $< 10^6$ virions/ml, les valeurs données par NTA ne sont pas statistiquement fiables vu que pour ces concentrations on est sous la LOD. En revanche, les solutions diluées sont toujours quantifiables par virométrie en flux mais elles nécessitent une durée de vidéomicroscopie plus longue. Il apparait que la virométrie développée est 10 fois plus

sensible que la technique NTA pour un même intervalle de temps d'analyse et 100 fois plus sensible avec un temps d'analyse supérieur à 3h.

La technique NTA a été aussi utilisée pour quantifier la production virale d'une population de cellules HEK 293 polyclonale. Quatre aliquots ont été analysés dont un est quantifié par la virométrie en puce de détection (A2 du tableau 1). Les résultats du NTA sont présentés dans le **Tableau 4** et révèlent un taux moyen de production de 78 ± 19 virions / cellule / h, comparable avec les données obtenues par puce.

N° Aliquot	Concentration (virions / ml)	Taux de production (virions / cellule / heure)	Moyenne \pm ESM (virions / cellule / h)
A1 (=A2 tableau 1)	$1,4 \pm 0,3E+08$	79	78 ± 19
A2	$1,4 \pm 0,2E+08$	79	
A3	$5,2 \pm 0,7E+07$	29	
A4	$2,2 \pm 0,5E+08$	124	

Tableau 4: Quantification par la technique NTA de la production virale de 5h à partir de population de cellules HEK 293 polyclonale

Quatre aliquots de différentes collectes de production virale d'une population de cellules HEK 293 polyclonale sont analysés par NTA. Le premier aliquot (A1) représente le même aliquot A2 analysé par la virométrie. La moyenne \pm ESM est calculée à partir du taux de production (virions / cellule / h).

En additionnant les valeurs obtenues par la virométrie (**Tableau 2**), on obtient une moyenne finale de **77 ± 16 virions / cellule / h**. La comparaison de la production virale des cellules HEK 293 avec celle des cellules HeLa ne révèle pas de différence significative ni en terme de taux de production ni en pourcentage d'hétérogénéité (15,3 et 20,2% pour les cellules HeLa et HEK 293, respectivement) suggérant que la biogenèse des VLPs est indépendante du type cellulaire et s'effectue via le même mécanisme (**Figure 39**).

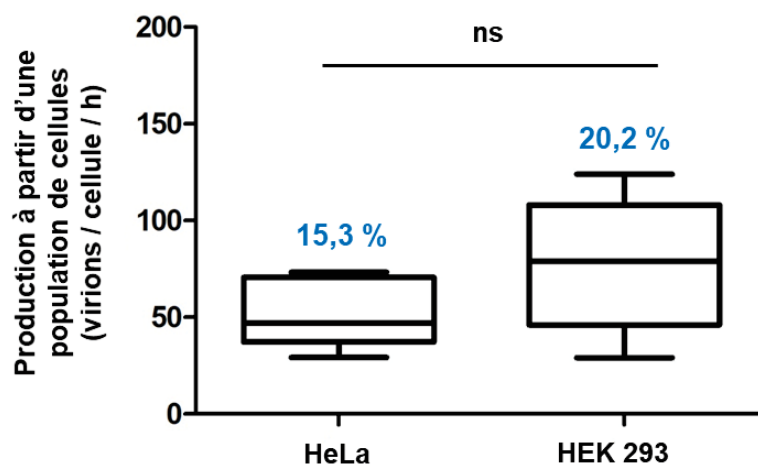


Figure 39: Taux de production virale à partir de population de cellules HeLa monoclonales et HEK 293 polyclonales.

Pour les cellules HeLa monoclonales, le résultat est obtenu en moyennant les cinq aliquots quantifiés par virométrie en flux, tandis que pour les cellules HEK 293 la valeur représente la moyenne obtenue par les deux techniques. Le pourcentage représente l'hétérogénéité définie pour chaque type cellulaire à partir de la moyenne \pm ESM. Pas de différence significative entre les deux moyennes des deux types cellulaires ($p = 0.19$).

Un avantage indéniable du NTA est la quantification des nanoparticules non-fluorescentes d'origine cellulaire (EVs) en lumière diffusée. Ainsi, l'analyse des valeurs NTA obtenues en lumière diffusée et en GFP pour la production des cellules HEK 293 nous permet d'établir le pourcentage de la production virale par rapport à la totalité des nanoparticules (EVs+VLP-GFP). C'est le rapport entre la valeur moyenne obtenue par fluorescence ($1,4 \pm 0,2 \times 10^8$ VLPs/ml) et celle par lumière diffusée ($7,7 \pm 2 \times 10^8$ nanoparticules/ml). En moyenne, les VLPs représentent $\sim 18\%$ de la production cellulaire totale.

3. Etude de la dynamique de relargage de VLPs en temps réel à l'échelle de la cellule unique

3.1. Puce couplée première génération

Pour étudier la production virale de cellule unique en temps réel il faut coupler la virométrie de flux à la capture cellulaire, maintenant que ces deux fonctions ont été testées séparément et validées.

La puce couplée est constituée de deux entrées (E1 / E2), deux sorties (S1 / S2), un piège en V et un canal de détection (**Figure 40**).

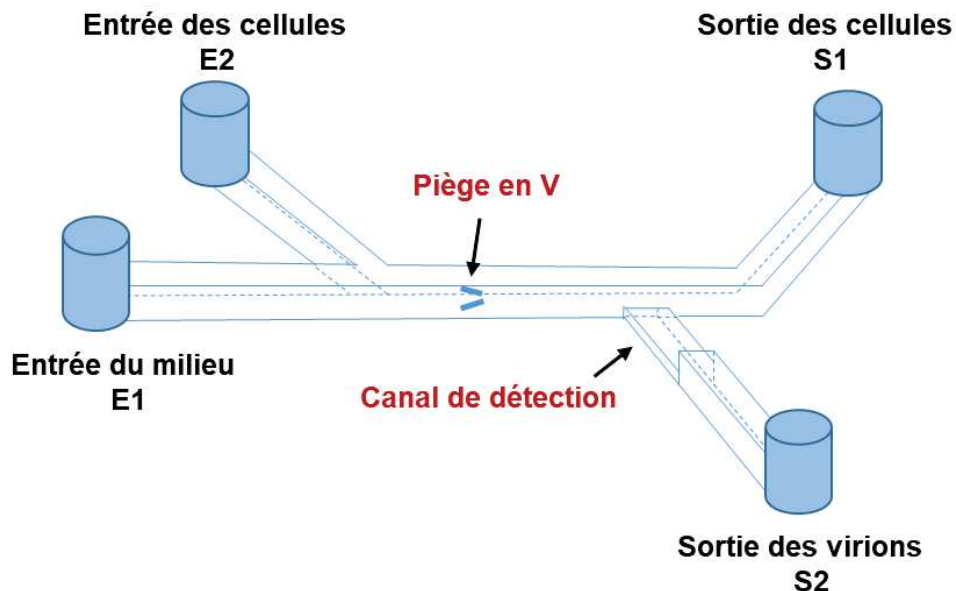


Figure 40: Représentation schématique de la puce couplée 1ère génération.

La puce couplée 1ère génération est constituée de deux entrées (E1 et E2), deux sorties (S1 et S2), un piège en forme V qui assure la capture d'une cellule unique et un canal de détection qui permet la détection et la quantification des virions à l'échelle de la particule unique.

La combinaison des deux échelles micrométrique et nanométrique nous met face à plusieurs défis. En effet, ce système exige un contrôle plus minutieux des pressions au niveau des différentes sections de la puce. Le couple de pressions appliqué doit assurer : un reflux continu vers l'entrée des cellules et un flux du milieu vers le canal de détection pour amener tous les virions produits par la cellule piégée

vers le canal de détection situé en aval du piège. De plus, les vitesses au niveau des différentes régions de la puce doivent assurer des contraintes de cisaillement minimales sur la cellule piégée et une détection de tous les virions produits par la cellule.

La puce couplée est manipulée selon la procédure suivante : après avoir traitée la puce au plasma oxygène, le mouillage est effectué en utilisant du milieu conditionné contenant le marqueur de viabilité IP (2 µg/ml) au niveau de l'entrée E1. Après mouillage, l'entrée E2 et la sortie S1 sont bloqués tandis que l'extrémité S2 est maintenue ouverte pour assurer le mouillage du canal de détection. Après trypsinisation, les cellules HeLa monoclonales productrices de VLPs sont introduites avec une concentration finale $\sim 10^5$ cellules/ml au niveau de l'entrée E2 après la fermeture de E1 par le robinet et l'ouverture de S1. A ce moment, un seul flux provenant de E2 vers S1 permet la capture de cellule unique. Une fois la cellule piégée (**Figure 41**), la pression au niveau E1 est augmentée avant l'ouverture du robinet et celle au niveau E2 est réduite. Ensuite, E1 et S2 sont ouvertes et S1 est fermée.

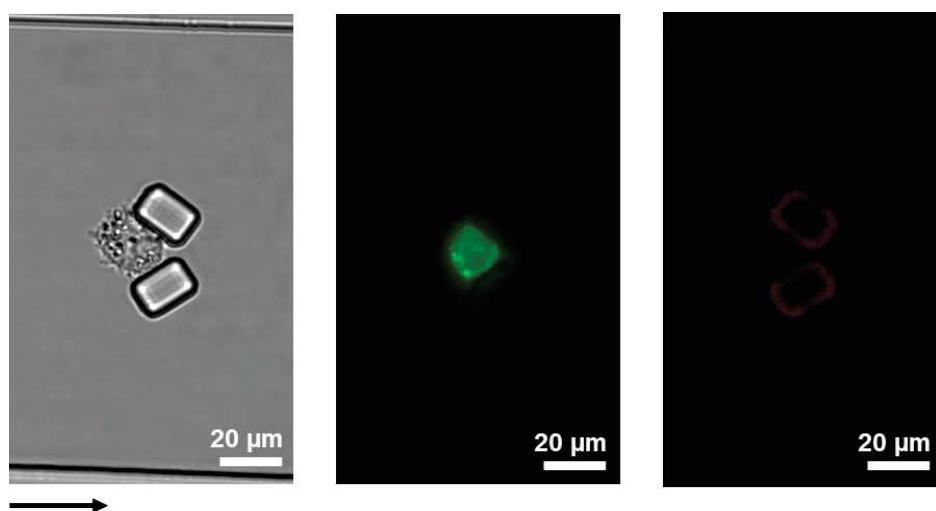


Figure 41: Cellule HeLa produisant des VLP-GFP piégée dans la puce couplée.

Les trois photos représentent la cellule en lumière blanche (à gauche), en fluorescence GFP (au milieu, λ excitation= 470 nm, Texp 150ms, Intensité I. 15%) et avec de l'iodure de propidium IP dans le milieu conditionné (à droite, λ excitation= 538 nm, Texp 60ms, I: 10%). La cellule reste en vie durant les 4h d'immobilisation (IP négative). L'observation est effectuée avec l'objectif 40x et un ROI délimite en x le piège et en y les deux parois du microcanal. La flèche noire montre le sens du flux.

Les pressions appliquées au niveau de E1 et E2 sont définies dans les systèmes d'équation ci-dessous en appliquant la loi de la conservation du débit (**Figure 42**).

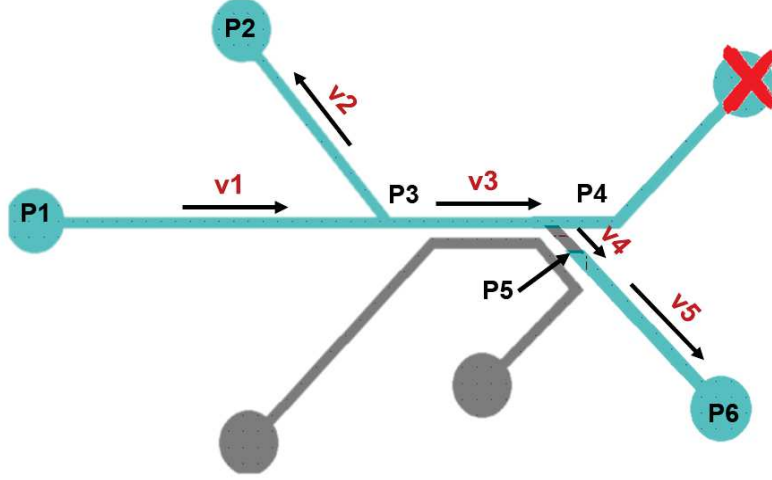


Figure 42: Représentation schématique des vitesses et des pressions dans les différentes sections de la puce couplée.

La croix rouge montre le blocage de la sortie des cellules par la fermeture du robinet externe une fois la détection des VLPs est déclenchée.

$$\left\{ \begin{array}{l} v_1 = v_2 + v_3 \\ v_1 = \frac{h_1^2 (P_1 - P_3)}{12\mu L_1} = 938 (P_1 - P_3) \mu m/s \\ v_2 = \frac{h_1^2 (P_3 - P_2)}{12\mu L_2} = 1499 (P_3 - P_2) \mu m/s \\ v_3 = \frac{h_1^2 (P_3 - P_4)}{12\mu L_3} = 11753 (P_3 - P_4) \mu m/s \end{array} \right. \quad (S1)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} v_3 * w_1 * h_1 = v_4 * h_2 * w_2 \\ v_4 = \frac{h_2^2 (P_4 - P_5)}{12\mu L_4} = 585 (P_4 - P_5) \mu m/s \end{array} \right. \quad (S2)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} v_4 * w_2 * h_2 = v_5 * h_1 * w_3 \\ v_5 = \frac{h_1^2 (P_5 - P_6)}{12\mu L_5} = 1753 (P_5 - P_6) \mu m/s \end{array} \right. \quad (S3)$$

Expérimentalement, elles sont appliquées d'une façon à assurer un reflux continu de E1 vers E2 durant toute la durée de l'expérience. Le flux provenant de E1 alimente la cellule piégée en milieu de culture et amène les virions relargués vers le canal de détection (**Figure 43**).

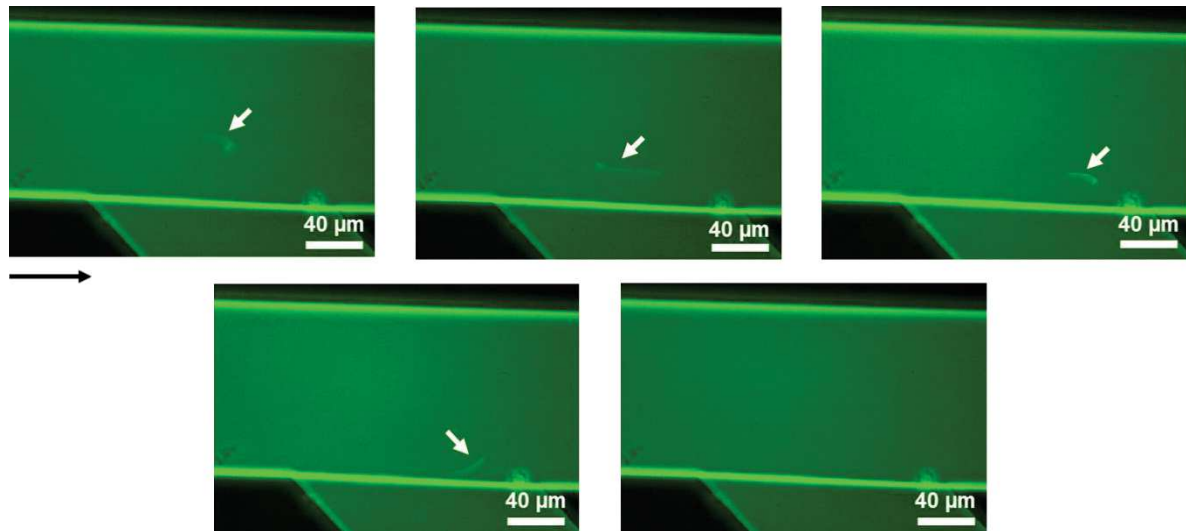


Figure 43: Observation d'une VLP-GFP traversant le canal de détection

La figure montre un virion (indiqué par la flèche blanche) produit par la cellule piégée et détecté en temps réel. Il suit les lignes de flux le long du canal principal (trois premières photos, en haut) pour rentrer dans le canal de détection (quatrième photo, en bas) et continuer jusqu'à la sortie S2 (cinquième photo, en bas). La flèche noire représente le sens du flux. L'observation est effectuée avec l'objectif 40x à l'air, λ excitation= 470 nm, Texpo: 150ms, Intensité I: 100% avec binning 2.

Après capture d'une cellule unique, les pressions appliquées durant la détection en temps réel sont $P1= 7\text{mbar}$, $P2= 4\text{ mbar}$ et $P6= 0\text{ mbar}$. En remplaçant ces valeurs dans les systèmes d'équation ci-dessus on obtient : $v2= 1409\text{ }\mu\text{m/s}$, $v3= 543\text{ }\mu\text{m/s}$ et $v4= 2562\text{ }\mu\text{m/s}$. La valeur positive de la vitesse $v2$ signifie la présence d'un reflux de l'entrée E1 vers l'entrée E2 et donc l'absence de toute contamination provenant de l'entrée des cellules. D'autre part, malgré la grande valeur de la vitesse $v4$, on arrivait toujours à garder la sensibilité de la détection puisque la vidéomicroscopie se fait à l'intersection du canal principal et du canal de détection et on réussit à bien visualiser les trainées des virions traversant cette région.

Au total, une quinzaine de cellules ont été piégées, mais l'étude de la dynamique du relargage viral a été réussie pour deux cellules uniquement. Le problème rencontré dans les autres expériences est dû à une contamination

provenant du puit S1, malgré la fermeture du robinet correspondant et l'existence d'une pression nulle. La quantification des virions relargués en fonction du temps par une des deux cellules est présentée dans le graphe de la **Figure 44**. La production virale a été mesurée pendant 2h séparées de 1h. Cet intervalle d'1h correspond à l'inspection des autres régions de la puce afin de vérifier la continuité du flux (absence de bulles d'air), l'absence de toute contamination et la viabilité de la cellule piégée. La cellule a produit en moyenne 42 virions / h avec 54 virions pendant la première heure et 30 virions pendant la deuxième heure de détection. La réduction de la production virale au cours du temps peut être due à plusieurs facteurs qui seront traités dans la partie discussion. Pour la deuxième cellule, un même ordre du taux de production virale est identifié (46 virions / h).

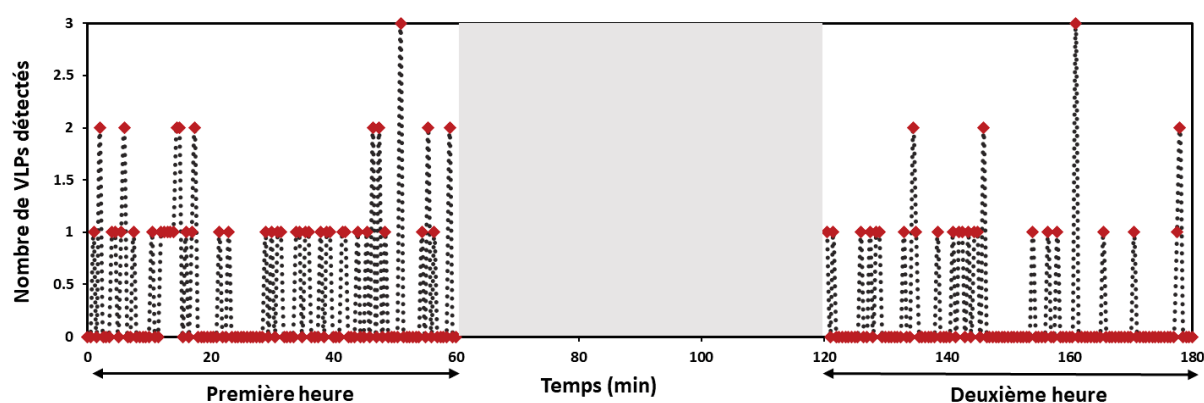


Figure 44: Cinétique en temps réel de la production virale d'une cellule HeLa unique

Le graphe montre la cinétique de la production virale d'une cellule unique HeLa productrice des VLP-GFP piégée dans la puce couplée de 1^{ère} génération. La dynamique du relargage est étudiée pour une durée de deux heures séparées d'une heure (rectangle en gris). Les losanges en rouges représentent le nombre de virions détectés chaque 30s.

Suite aux problèmes de contamination rencontrés, une deuxième génération de puce couplée a été fabriquée que nous appelons la puce couplée multiplexe.

3.2. Puce couplée multiplexe deuxième génération

La puce couplée multiplexe diffère de la puce couplée de 1^{ère} génération par l'orientation du canal de détection par rapport au canal de capture cellulaire. Afin d'augmenter les chances de réussite, nous avons parallélisé 10 systèmes couplés perpendiculairement au canal principal de perfusion et à la sortie des cellules. Chaque système est constitué du canal de capture prolongé par le canal de détection (**Figure 45**). Durant ma troisième année de thèse, j'ai pu tester le fonctionnement de cette puce avec les deux types cellulaires HeLa monoclonale et HEK 293 polyclonale productrices des VLP-GFP.

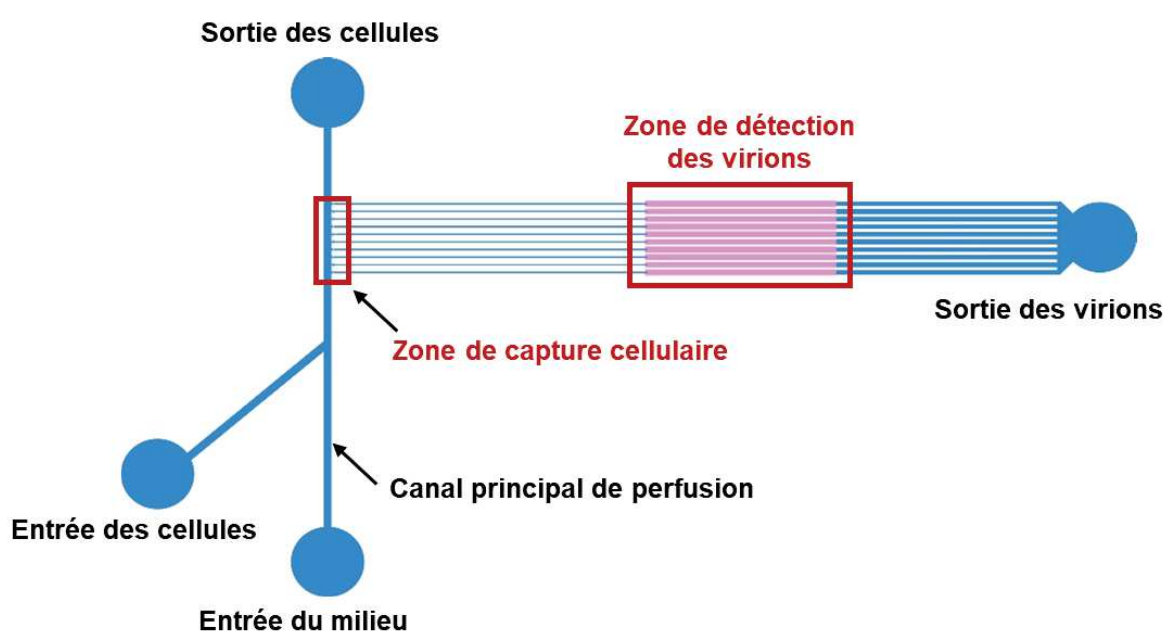


Figure 45: Représentation schématique de la puce couplée multiplexe.

La puce couplée multiplexe est constituée de 10 systèmes parallèles couplés entre eux et perpendiculaires au canal principal de perfusion et à la sortie des cellules. Chaque système est constitué d'une zone de capture de cellule suivie d'une zone de détection des virions relargués par la cellule piégée.

Ainsi, la puce couplée multiplexe nous a permis de faire la preuve de concept de notre approche technologique. Elle nous a permis de déterminer pour la première fois la cinétique de production de VLP VIH-1 à l'échelle de la cellule unique. De façon inattendue, nos résultats révèlent le caractère périodique de cette production virale, qui n'aurait pas pu être décelé en étudiant une population de cellules.

RESUME

La visualisation et la quantification en temps réel des virus libérés par une cellule dans l'environnement extracellulaire sont cruciales pour mieux comprendre les mécanismes d'infection virale. Les données disponibles sur la production virale de cellules en culture restent globales et approximatives, car elles proviennent de populations cellulaires dont la cinétique de réplication virale est hétérogène et asynchrone. Des études cinétiques au niveau d'une seule cellule sont nécessaires pour contourner ces limitations. Pour le faire, nous proposons une approche "viro-fluidique" qui combine la microfluidique et la virologie à l'échelle de la cellule et de la particule uniques. Comme modèle expérimental, nous avons utilisé le virus pandémique VIH-1 en utilisant des lignées cellulaires produisant des pseudo-particules fluorescentes (VLP). Tout d'abord, pour adapter la stratégie au niveau de la cellule unique, nous avons validé un système de virométrie en flux sensible pour détecter les particules virales dans des échantillons à faible concentration ($\geq 10^4$ VLP/mL). Ensuite, ce système a été couplé à un dispositif de piégeage de cellule unique pour réaliser la viro-fluidique en temps réel.

Nous avons démontré la capacité de notre système à suivre en temps réel les virus libérés, un par un, par des cellules uniques dans des conditions de culture cellulaire. Nos résultats révèlent un taux de production moyen de 50 VLP / cellule / h avec des pics toutes les ~ 4 minutes. Cette périodicité inattendue de libération révèle l'existence d'étape(s) limitante(s) au cours de la formation des particules virales. Ces données seraient masquées par l'étude de population de cellules. Ainsi, malgré leur remarquable simplicité, les approches développées ont permis l'observation directe et la quantification de virions uniques dans des conditions de culture cellulaire et ont fourni de nouvelles informations sur le mécanisme de production virale. Elles peuvent être transposées à l'étude d'autres pathogènes ou des vésicules extracellulaires. Les outils développés ici sont prometteurs pour élucider les mécanismes de dissémination de ces nanoparticules biologiques.

Viro-fluidics: Real-time analysis of virus production kinetics at the single-cell level

Joëlle Eid¹, Marius Socol^{1*}, Antoine Naillon², Jérôme Feuillard¹, Luca Ciandrini³, Emmanuel Margeat³, Benoit Charlot⁴, and Marylène Mougel^{1*}

¹Team R2D2: Retroviral RNA Dynamics and Delivery, IRIM, UMR9004, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France.

²Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, 3SR, Grenoble, France.

³CBS, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France.

⁴IES, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

*Correspondence: marylene.mougel@irim.cnrs.fr; marius.socol@irim.cnrs.fr

Abstract

Real-time visualization and quantification of viruses released by a cell are crucial to further decipher infection processes. Kinetics studies at the single-cell level will circumvent the limitations of bulk assays with asynchronous virus replication. We have implemented a "viro-fluidic" method, which combines microfluidics and virology at single-cell and single-virus resolutions. As an experimental model, we used standard cell lines producing fluorescent HIV-like particles (VLPs). First, to scale the strategy to the single-cell level, we validated a sensitive flow virometry system to detect VLPs in low concentration samples ($\geq 10^4$ VLPs/mL). Then, this system was coupled to a single-cell trapping device to monitor in real-time the VLPs released, one at a time, from single cells under cell culture conditions. Our results revealed an average production rate of 50 VLPs/h/cell similar to the rate obtained for the same cells grown in population. Thus, the virus-producing capacities of the trapped cells were preserved and its real-time monitoring was accurate. Unexpectedly, the release was not linear but in bursts of ~4 minutes, revealing the existence of limiting step(s) in the virus biogenesis process. Our tools can be applied to other pathogens or to extracellular vesicles to elucidate the dissemination mechanisms of these biological nanoparticles.

Introduction

The development of hydrodynamic-based microfluidic biochips has revolutionized biology and the fields of health sciences by enabling studies at the single-cell scale 1-3. It has also greatly contributed to the recent development of single-cell virology (for a review see 4,5). A large panel of strategies has been developed based on microwells, microvalves, and droplets for studying viral infection at the single-cell level. Typically, droplets have been applied to high-throughput screening 6-9, and microwell- and valves-based technologies to multiparameter analysis and infection dynamics analysis 10-12.

In the field of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), responsible for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) pandemic, the microfluidics has been mainly used for the diagnostics of AIDS with the detection of viral nucleic acids or anti-HIV antibodies 13, and for high-throughput screening of therapeutic tests 14-16 or transcriptome analysis 17-19 (for a review see 20). Here, we implemented a "viro-fluidics" approach that combines continuous microfluidics using chips fabricated from polydimethylsiloxane (PDMS) and virology under cell culture conditions. Our goal is to study the real-time kinetics of virus production, masked by bulk assays, through uninterrupted single-cells culture and continuous single-virus imaging. As a proof of concept, we applied viro-fluidics to study the release of HIV-1 VLPs from a model cell system, which does not require BL3 safety practices.

The biogenesis of HIV-1 in cell is well documented (for review see 21) including late steps such as virus assembly at, and budding from, the plasma membrane. These late stages are driven by the structural polyprotein Gag which has the ability to self-assemble by thousands and release VLPs with the native conformation of the virus but without genetic material 22,23. This is why VLPs are commonly used as an experimental model to study the late steps of HIV biogenesis. In addition, the study of VLPs production is also relevant for vaccination strategies, as these non-infectious particles are promising platforms for vaccine candidates due to their potential to generate high immunogenic responses with few side effects 24. Assembly and budding events are frequently studied in human HeLa or HEK293 cellular models

expressing labelled HIV Gag, mainly using advanced live cell fluorescence imaging techniques 25-30. However, the final step of virus release into the extracellular space, crucial for understanding the mechanisms of virus production and virus-host interplay, remains incompletely deciphered. Studying cell populations with heterogeneous HIV-1 replication kinetics would provide global and approximate data. An approach is therefore needed at the single-cell level to address the dynamics of virus release and provide information on the amount of virus produced, the production rate, the frequency, as well as the heterogeneity of virus production between cells. The system must also allow visualization and quantification of individual VLPs with high sensitivity, since VLPs exiting a single cell are at low concentration with stochastic occurrence in the culture medium flow. VLP fluorescence guarantees the specificity of the detected signals and avoid contamination with the numerous cellular vesicles also released by the cell (EVs).

First, we set up a virometry device specifically designed to detect individual fluorescent VLPs in flow. Its performances were tested by a commercial device: Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 30,31. The remarkable simplicity of our flow virometry system makes it a useful and inexpensive tool for virologists who need to detect and quantify viral particles directly in a biological sample (without a concentration step). We then integrated this tool downstream of a single cell trapping microfluidic device to visualize each VLP produced by a single living cell and released into the flow. The chip operated at different scales of analysis (micro- and nano-metric) with cells of about 15 μm and VLPs of about 140 nm in diameter (visualized with a 40x objective). This viro-fluidic chip was able to capture and immobilize single cells in a flow without damage, maintain the cells trapped and perfused for several hours without apoptosis/necrosis, and detect and quantify each VLP released one at a time from the single cell. Cellular abilities to produce virions were not disturbed by the microfluidic system since similar production rates were found in population-scale experiments performed with the same cells concomitantly. The viro-fluidics tool provided access to the dynamics of HIV production and revealed that production occurred at a rate of tens of VLPs per hour. This did not increase gradually over time as first suspected, but followed a release mechanism with bursts of ~ 4 min, revealing that one or more limiting steps regulate the virus formation mechanism.

Materials and Methods

Cell-lines producing fluorescent VLPs

Stable human cell lines HeLa ($17 \pm 5 \mu\text{m}$) or HEK293 ($13 \pm 4 \mu\text{m}$) that produce HIV non-infectious fluorescent VLPs were established. Cells were cultured in medium with or without phenol red (F12) and supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) at 37°C and 5% CO_2 . They were transfected with a plasmid expressing HIV-1 Gag protein fused to GFP and carrying a positive selection marker (geneticin resistance) by using JetPei reagent (Polyplus), as previously described³² (Fig. 1). Two-days after transfection, the cells were treated with geneticin G418 and after two weeks, fluorescent G418-resistant transfected cells were sorted by FACS. The positive HEK293 cells were pooled, expanded, and saved as polyclonal cell line. Alternatively, single positive HeLa cells were sorted by sequential dilutions and one cell was expanded to establish monoclonal cell population (Fig. 1).

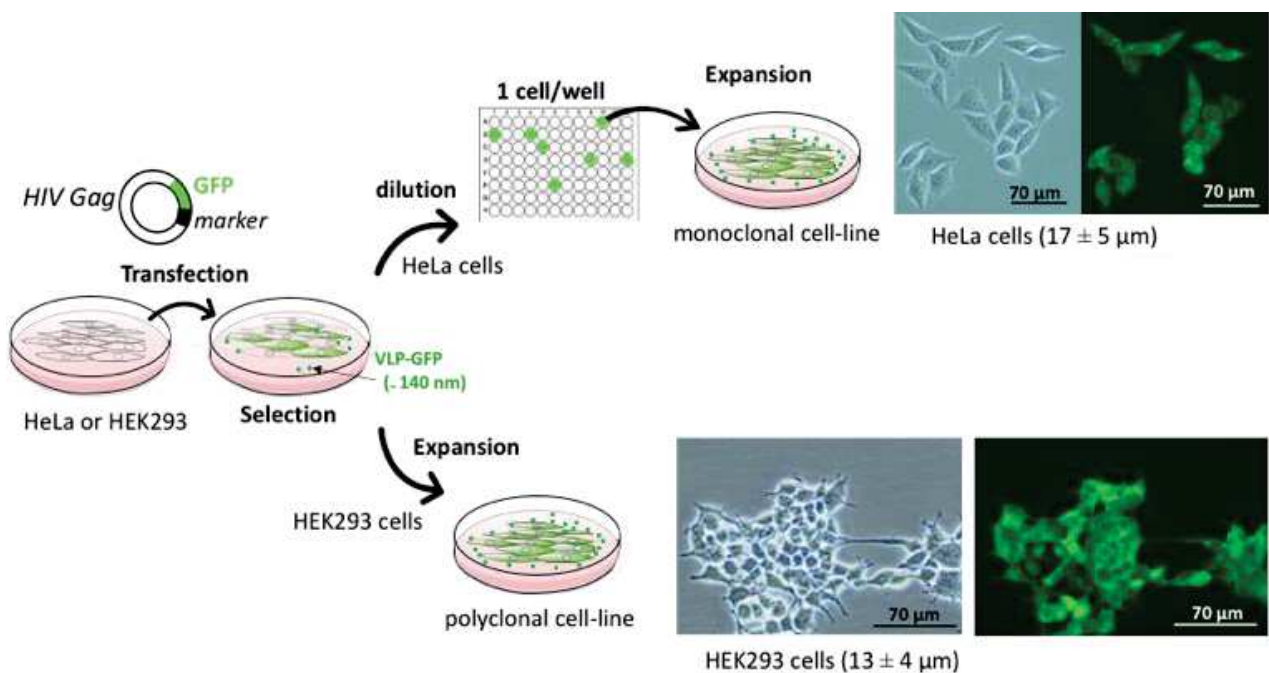


Figure 1: Cellular biology aspects of viro-fluidics. Schematic steps in the establishment of stable cell lines. Pictures are cells imaged after sorting with a 20x objective in bright field (left) and fluorescence (right). The cell culture showed ~80% of fluorescent cells.

Preparation of viral samples

Viral stocks were classically made by harvesting the medium from GFP-Gag producing cells after 48h of culture and filtered through 0.45 μm filter to remove cell debris or cells. For NTA experiments, VLPs were concentrated by ultracentrifugation through a 20 % sucrose cushion at 100 000 x g for 1h30 at 4 °C. The VLP pellet was resuspended with 100 μl of nanoparticles-free PBS, aliquoted and stored at -80°C. To estimate viral production rate from a population of cells, cells ($3 \pm 0.6 \times 10^6$) were seeded in 10 cm plate in F12 medium (10 mL). After 5 hours of growth, the fluorescent cell proportion (NP_cell) was determined from more than 30 bright field and fluorescence microscopy images of the culture dish. VLP-containing medium was collected by gently pipetting up and down (twice) on the adherent cells to detach VLPs and filtered through 0.45 μm filter. Then, the cells were detached, washed with F12 and centrifuged at 1500 rpm at room temperature before counting them using Malassez counting chamber.

NTA experiments

NTA was performed with a NanoSight LM-10 instrument (Malvern) equipped with a blue laser module (488 nm) for fluorescent VLPs and NTA 2.0 software (Malvern Instruments Ltd., UK). The camera was fixed at maximal level and flow rate was adjusted at 26 $\mu\text{l}/\text{min}$ in order to have 10-100 particles/frame for reliable statistical analysis. Three movies of 60 s were captured at room temperature. Each movie was analysed three times by using a set of optimized analysis parameters for VLPs detection, which were kept constant during all measurements. The apparatus was calibrated by using monodisperse fluorescent 100 nm beads (Tetraspek, 1.8×10^{13} particles/mL).

Design, fabrication, and operation of the microfluidic chips

The microfluidic devices were made from PDMS, which has several advantages, such as flexibility in device design, low-cost, and proven properties for cell growth³³. Two different microarrays were designed with Clewin software:

- The flow virometry chip (Fig. 2A) has two identical parallel microchannels, 460 μm apart, 8 mm long, 130 μm wide. We used two different heights to test that all fluorescent VLPs were detected when transported at different speeds through the 40x

objective field of view with height of 3.7 μm or 6.7 μm . The projected half-height ($h/2$) of the channels was approximately 1.3 and 2.3 -fold of the depth of field ($\text{DOF} = 1.44 \mu\text{m}$) for h : 3.7 and 6.7 μm , respectively.

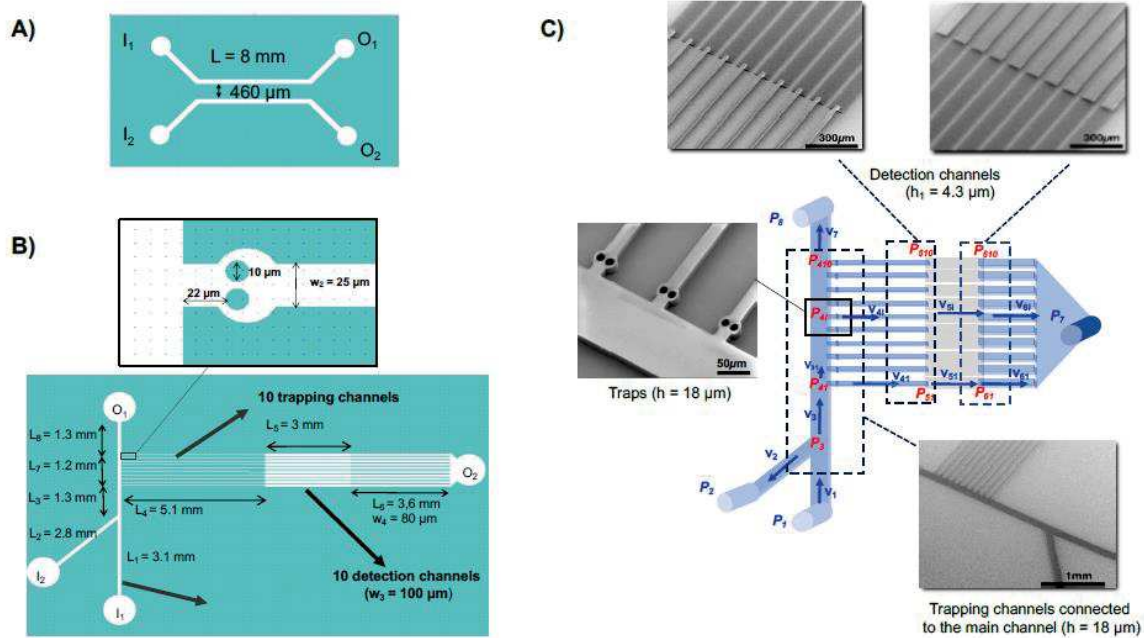


Figure 2: Microfluidic devices. (A) 2D-Clewin drawing of the virometry chip. Each microchannel has an inlet (I) and an outlet (O). (B) 2D-Clewin of the viro-fluidic chip. Ten individual trapping channels were disposed upstream of 10 detection channels and perpendicular to the main channel connecting the inlet (I_1) and outlet (O_1). Cells were perfused in I_2 and the viral particles exited through O_2 . Lengths (L_i) and widths (w_i) of each microchannel section are indicated. The upper inset gives an enlargement of a trap that was composed of two cylindrical pillars ($d = 10 \mu\text{m}$) separated by $4 \mu\text{m}$. (C) Images of scanning electron microscopy of the master mold (grey rectangles) of the viro-fluidic chip show the photosensitive resist (SU8) deposited on a Si wafer. The central drawing shows the trapping channels (h : $18 \mu\text{m}$) in blue and the detection channels (h : $4.3 \mu\text{m}$) in grey. The external applied pressures and average flow speeds in each channel section are shown in blue and the internal pressures in red.

-The viro-fluidic chip (Fig. 2B) integrates single cell capture and real-time detection of viruses produced. It has two inlets connecting a main channel (h : $18 \mu\text{m}$) that feed several parallel channels containing the single cell trapping area. This area contains two pillars which capture the cell. These channels are followed by thinner channels (h : $4.3 \mu\text{m}$) that define the virus detection area placed on a 40x objective (Fig. 2C). To detect the produced VLPs passing in the flow, the sensing area is spaced 5 mm away from the cell traps to avoid bright cell fluorescence and photobleaching of intracellular GFP during VLP imaging (Fig. 2C). Our field of view (40x objective, binning 2) limits the analysis to 2 whole sensing channels, simultaneously. The multiple trapping

channels increased the probability of trapping two GFP cells contiguously, since cell samples also contained non-fluorescent cells (20%). Note that the hydrodynamic resistance in the virus detection zone decreases proportionally with the number of channels.

Manufacturing protocol

The microfabrication was made in clean room by standard photolithography using SU-8 photoresist. Layouts of the devices were transposed into a glass and chromium mask (Fig. 2A, B) by the Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS, CNRS France). SU8 photoresist was spin coated on a 7.6 cm silicon wafer, exposed to UV, post baked and developed. For the flow virometry chip, we planned the resist height at 4 ± 1 and 7 ± 1 μm , respectively. The heights of the reticulated photoresist were measured by a profilometer. These steps were repeated for each channel level. For the viro-fluidic device, an additional reactive ion etching procedure was made by applying a plasma etching process during 2 min (mixture CHF_3 and O_2 gazes) between the two photolithography steps. Thus, a small step of 100 nm deep was added in the silicon wafer to render the first SU8 layer visible during the alignment. Then, standard PDMS replica molding process was used. A PDMS mix (Sylgard184) with a reticulating agent (10:1 PDMS/reticulate ratio) was prepared, degassed, poured onto the SU8/silicon master mold, and baked at 70°C for two hours. PDMS chips were removed from the mold and sliced. Supply holes were punched. And chips were cleaned, and permanently bonded on cleaned (acetone/isopropanol) coverslips using an O_2 plasma surface activation.

Operation

For flow virometry experiments, one microchannel was loaded with a viral sample and the other with a 100 nm fluorescent beads solution to focus at $z = h/2$. To characterize the flows inside the chip, same beads were injected continuously into both channels by using a microfluidic flow control system (MFCS, Fluigent).

The viro-fluidics experiments were conducted as follows. After extemporaneous O_2 plasma treatment, the chip was washed for 1h with F12 "conditioned" medium. This is an F12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (PI) and diluted twice with a medium previously harvested from a dish of parental cells (non-producing VLPs) grown to 40 % confluence. The serum prevented adherence of VLPs to PDMS and glass surfaces. Cell viability was monitored throughout the experiment by PI staining, a low cytotoxic dye. Then, the cells, freshly collected from a dish culture and adjusted at 10^5 cells/mL, were

introduced in the cell perfusion well (I2, Fig. 2B), keeping the medium tap closed. When cells were trapped, the medium tap was opened and a pressure P1 was applied in the inlet medium (I1) to perfuse the captured cell with conditioned medium and to carry away the produced VLPs in the sensing channel where they were monitored in time for several hours. This also caused a reflux towards the cell seeding well, flushing out extra cells and extra viral particles. A continuous flow towards the outlet well, O1, was also insured. Throughout the experiment, the VLPs were imaged with a 40x objective placed under the virus detection area. However, brief interruptions were made to check cell viability by moving the objective lens to the trapping area and by decreasing the exposure time and the LED power.

Extended hydrodynamic model for the design of the viro-fluidic chip

For all experiments, the Reynolds number was lower than 0.02 so, much lower than 1 (microchannels height < 18 μm and speeds less than a few mm/s). In this case the inertial term was neglected and therefore, Navier–Stokes equation reduces to the Stokes equation, and the flow was laminar. For a pressure-driven flow and a non-compressible Newtonian fluid, considering the following set of assumptions: the channel cross section is rectangular, the flow was steady and symmetric, the mass conservation was respected, the velocity was independent of x and only the x component of the velocity was non-zero, Stokes equation could be reduced to:

$$\frac{d^2v(y,z)}{dy^2} + \frac{d^2v(y,z)}{dz^2} = -\frac{\Delta P}{\mu L} \quad (\text{Eq. 1})$$

where ΔP was the pressure drop along the length L, and μ was the dynamic viscosity of the liquid.

Considering no-slip conditions on both walls ($v(0) = v(h) = 0$) and the geometrical parameters shown in Fig.1S (left panel), one gets the input flow rate Q and the average flow velocity v in a channel with a rectangular cross section (see ³⁴ for a complete demonstration):

$$Q = \frac{\Delta P h^3 w}{12 \mu L} \delta = \frac{\Delta P}{R_h} \quad (\text{Eq. 2}) \quad v = \frac{Q}{S} = \frac{\Delta P}{R_h w h} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Where } \delta = 1 - \sum_{n, \text{odd}}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{195}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \text{ and } R_h = \frac{12 \mu L}{h^3 w \delta}$$

δ depends only on the aspect ratio of the channel and tends to 1 for very wide channel in which the velocity profile is parabolic. For example, it is equal to 0.99 for the channels of 3.7 μm height and 130 μm width in virometry chip. R_h is the hydrodynamic resistance of the channel.

In the case of a bifurcation (see for example, Fig. S1 right), mass conservation of incompressible flow implies:

$$Q_m = Q_{s1} + Q_{s2} \Leftrightarrow v_m S_m = v_{s1} S_{s1} + v_{s2} S_{s2} \text{ (Eq. 4)}$$

where index m refers to the main channel and indexes s1 and s2 refer to the secondary channels. When there is no bifurcation but only a cross section change, Eq. 4 simplifies in: $v_u S_u = v_d S_d$ (Eq. 5)

Where indexes u and d refer to upstream and downstream channels.

Eq. 4 or 5, combined with Eq. 3 can be applied to each linear section of the microfluidic circuit from viro-fluidic chip and give a linear system. This system can be solved as it is or by analogy between hydrodynamic and electrical resistances 35 to calculate all the velocities as a function of initial known parameters (P_1 , P_2 , P_7 , P_8 and the geometrical parameters depicted in Fig. 2B,C). This simple model, without considering the trap hydrodynamic resistance, was used to predict the average velocities in the detection channels and set the operating pressure.

In the following, we use index i for the segment of length L_i with respect to the notations shown in Fig. 2B,C. Also, δ was calculated for each linear section: $\delta = 0.95$ (in the main channel), $\delta_1 = 0.56$ (trapping section), $\delta_2 = 0.97$ (detection) and $\delta_4 = 0.85$ (VLPs output section).

For the sake of simplicity, first we have considered the 10 detection channels as one, with the same hydrodynamic resistance $R_{h,detection}$ of 10 parallel channels:

$$\frac{1}{R_{h,detection}} = \frac{10}{R_5 + R_6 + R_7} \text{ (Eq. 6)}$$

Thus, the problem is determining all the pressures. Eq. 4 expressed for bifurcations gives :

$$Q_1 = Q_2 + Q_3 \Rightarrow \frac{P_1 - P_3}{R_{h1}} = \frac{P_3 - P_2}{R_{h2}} + \frac{P_3 - P_4}{R_{h3}} \text{ (Eq. 7)}$$

$$Q_3 = Q_{detection} + Q_8 \Rightarrow \frac{P_3 - P_4}{R_{h3}} = \frac{P_4 - P_7}{R_{h,detection}} + \frac{P_4 - P_8}{R_{h8}} \quad (\text{Eq. 8})$$

This system of 2 equations (Eqs. 7 and 8) is solved straightforward because there are only 2 unknowns, P3 and P4. Then, considering that all pressure drops are the same in the 10 detection channels and equal to P4-P7, all internal pressure and average velocities can be solved. A numerical example is given in the Results section.

To visualize the stream lines and validate calculus, the hydrodynamic model including the pillars and cells presence was completed by finite element computational fluid dynamic simulation (Comsol). Flow stream lines speeds, shear rate ($\dot{\gamma}$) and shear stress on cell membrane and hydrodynamic resistances in trapping channels were computed.

Microscopy and image processing

We used a Nikon Ti2 inverted microscope equipped with a sCMOS back-illuminated camera Prime95B Photometrics (1200*1200 pixels and physical size of camera pixel of 11 μm). Illumination sources and emission filters for DAPI, GFP, Cherry, were piloted by Nikon Imaging Software. Analyses were conducted with the dry objectives 10X Plan Apochromat (numerical aperture NA = 0.45), 20X and 40X Plan Apochromat (NA = 0.75). The microscope was placed in a chamber at 37°C under 5 % CO₂. The moving particles were detected in the detection channels of the two chip types with the 40x objective with exposure time of 150 ms, binning 2 and 500 mW of LED power. The focus was done on the area at $z: \sim h/2$. The field of view of the imaging system limits the analysis to two microfluidic detection channels simultaneously. The image pixel size was 11 $\mu\text{m}^2/40$, resulting in pixel width of a 0.55 μm . In the case of 40x (NA = 0.75) and $\lambda_{\text{emission}} = 520 \text{ nm}$, the DOF was 1.44 μm .

All images and movies were treated with the Fiji software. Viral particles (or beads) were counted manually from videos by frame-by-frame analysis. Instantaneous speeds were calculated by dividing the distance (μm) that a nanoparticle ran during a frame, by its duration (Fig. S2). The focus was made approximatively at the half of the channel height, $z = h/2$ by the help of adhering beads in the reference channel. The maximum instantaneous speed (v_{max}) of a nanoparticle was calculated corresponding to the maximal flow line speed at $z = h/2$

and at $y = w/2$. Indeed, the streamlines velocities integration on 100 nm bead surface provided an error less than 0.03% by respect to the central flow streamline speed when $h = 3.7 \mu\text{m}$ and $v = 400 \mu\text{m/s}$. At least 30 nanoparticles were analysed. The one-frame diffusion along the x-axis was neglected when average flow speeds were higher than $47 \mu\text{m/s}$ which represents 10 times more than 1D characteristic length of diffusion for a 100 nm bead ($\sim 0.7 \mu\text{m}$ during 150 ms frame time). The hydrodynamic inter-particles interactions were also neglected when particles concentration was lower than 106 particles/mL 36. Moreover, because δ is close to 1 in the virometry channels, the velocity profile can be considered as parabolic and the average flow velocity was calculated as $v = 2/3 v_{\text{max}}$.

The concentration of VLPs (C) was then calculated by dividing the number of particles (Np), counted during the time analysis interval (Δt), by the analyzed solution volume ($Q^* \Delta t$):

$$C(\text{particle/mL}) = \frac{Np}{v * h * w * \Delta t} \quad (\text{Eq. 9})$$

Knowing C and in consequence the total number of VLPs ($Nt_VLPs = 10 * C$) produced by the productive cells (NP_cells, see Preparation of viral sample) during 5h in 10 mL we found the average viral production corresponding to one single cell (Average_VLP/h/cell):

$$\text{Viral production rate} = \frac{10 * C}{5 * NP_cells} = \frac{2 * C}{NP_cells} \quad (\text{Eq. 10})$$

Results and discussion

Flow virometry

The quantification of viral particles at low concentration in cell culture medium is not trivial 37-40. Nevertheless, we implemented a simple and sensitive microfluidic system for monitoring single viral particles produced at the single-cell scale (Fig. 3A). The device must allow the detection of each VLP appearing in the analysis field.

To do so, a compromise had to be found between sensitivity of detection and flow speed. Two devices were fabricated with heights of 3.7 or 6.7 μm (as measured by a profilometer) and narrow width (130 μm) that harbored different hydrodynamic

resistances. First, the flow speed was analysed as a function of pressure drop ($P-P_1$) by perfusing fluorescent beads (500 beads/ μl) in the reference channel (Fig. 3B). Previously, it was checked that $P = P_1 = 0$ mbar was the equilibrium state with no liquid transport, while only a homogenous Brownian motion of beads subsisted with no relative displacement of beads. Then, as expected we observed that the experimental values of average speeds followed a linear dependence in pressure drop for both channel heights. The predicted values given by Eq. 3 were also plotted (Fig. 3B). The experimental heights deduced from the two fitted slopes ($h = 3.7$ and 7.1 μm , respectively) were similar to the values of photoresist measured in clean room ($h = 3.7$ and 6.7 μm , respectively). Since the hydrodynamic laws were respected in the chips, they were validated for flow virometry.

Then, the tests were conducted with a diluted viral sample ($6.8 \pm 0.9 \times 10^6$ particles/mL) harvested from HeLa cell producing GFP-VLPs. Unlike beads, the viral particles showed different fluorescence intensities (Movie S1) likely due to the variable number (2000-4000) of Gag-GFP molecules per VLP 23. The motion blur generated by the flow speed could also alter the sharpness of signals. Samples were analysed with the two chips with $h = 3.7$ and 6.7 μm (Fig. 3C). The number of detected VLP decreased when the flow average speed exceeded 300 $\mu\text{m/s}$ or 130 $\mu\text{m/s}$ for chips with $h = 3.7$ or 6.7 μm , respectively. Indeed, for high speeds and despite the diffusion of VLPs in the z-axis, some of them stayed out of the DOF limits of the 40x objective before leaving the field of view. We concluded that the performance of both chips was equivalent at low flow speeds, and that the 3.7 μm -high chip with an $h/2$ approximating $1.3 \times \text{DOF}$ remained efficient over a wider speed range.

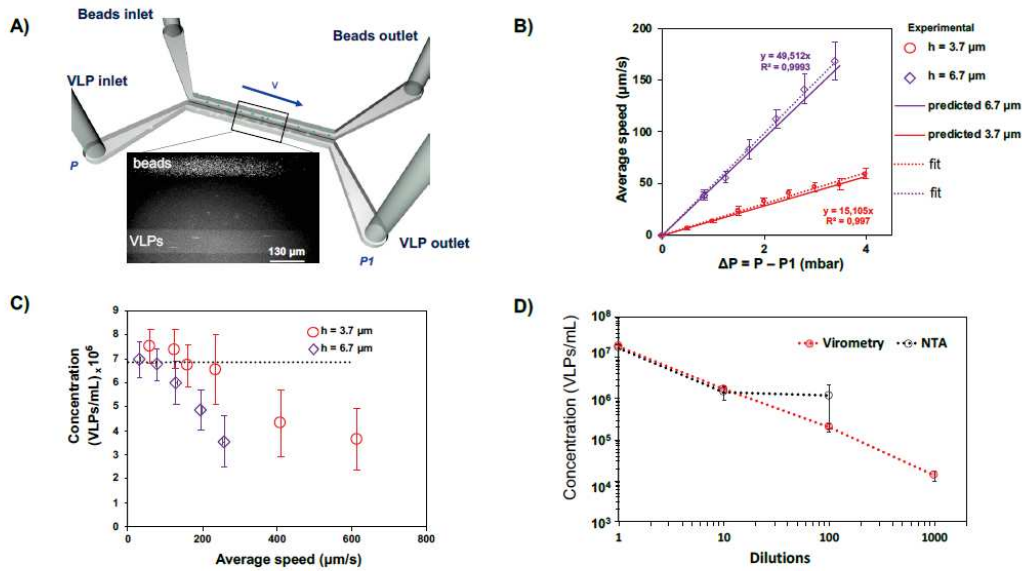


Figure 3: Flow virometry. (A) 3D representation of the detection chip showing the two parallel microchannels. One was filled with 100 nm fluorescent beads that adhered to the walls and served as reference for the second channel which was used for imaging VLPs by fast optical video microscopy. The inset shows an image of the two channels obtained with 20x objective. (B) Average speed (v) of beads as a function of the pressure between Inlet and Outlet ($P-P1$); The 6.7 and 3.7 μm high chips were tested. The dotted line represents the linear fit of the experimental mean speed and the solid lines the predicted v given by Eq. 3. (C). Concentration measurement for the same sample as a function of average flow speed (v), for both microchannel heights. The number of detected VLPs (signal/noise > 1.1) decreased for average speed of 300 and 130 $\mu\text{m/s}$ for the 3.7 and 6.7 μm high, respectively. The dotted line indicates the mean of the first 3 or 4 values of the measured concentrations. (D) Comparative analysis of the sensitivities of the flow virometry and NTA devices. The same diluted samples were analyzed by NTA or by the 6.7 μm high detection chip. The NTA lost linearity for 1/100 dilution with no VLP detected for the 1/1000 dilution. In contrast, the flow virometry system remained reliable in the concentration range of 10^7 to 10^4 VLPs/mL. Experiments were performed in triplicate.

The performance of our flow virometry system was compared to that of the commercial NanoSight instrument, a gold standard for measuring nanoparticles concentration. The NTA performs reliable measurements for concentrations between 10^7 - 10^9 particles/mL within a nanoparticle detection range of 10 and 100 particles/frame. A recent study showed that the low limit of detection (LLD) of this apparatus is 1.7×10^7 VLPs/mL ³¹. Therefore, we had to concentrate our samples for the comparative study (see Materials and Methods). The concentrations ($1.40 \pm 0.03 \times 10^8$ VLPs/mL) determined by NTA (Fig. S3A) were similar to that determined by the 6.7 μm height chip ($1.6 \pm 0.2 \times 10^8$ VLPs/mL) revealing the reliability of our system. To determine the concentration range that maintains the linear regime of our detection system, a series of successive dilutions were performed in PBS, starting from a sample at 1.75×10^7 VLPs/mL (Dilution 1). VLP concentrations were measured either by NTA or by the 6.7 μm high chip, when $v < 130 \mu\text{m/s}$ (Fig. 3D). Unlike NTA, our

system remained reliable for concentration of 10⁴ VLPs/mL (Movie S2). Our system has the advantage of detecting fluorescent particles in the entire volume of the microchannel while the NTA uses a flow chamber (h = 50 µm and w = 1 mm) with dimensions much larger than the laser focusing beam (axial depth, 10 µm and lateral field view, 500 µm, 20x objective), requiring strong statistical analysis. For highly diluted solutions, the NTA signals were noisy and unreliable peaks were obtained (Fig. S3B).

In addition, the NTA allows simultaneous characterization of the nanoparticles sizes. Since aggregation of two viral particles is rarely encountered for concentrations $\leq 4 \times 10^7$ VLPs/mL⁴¹, size analysis was conducted with a diluted viral sample ($1.14 \pm 0.13 \times 10^7$ particles/mL). We found 93% of particles with diameter $d = 148 \pm 16$ nm and 7% with $d = 315 \pm 26$ nm which might correspond to 2-aggregated viral particles (Fig. S3C). The size of our VLPs was similar to those determined by chromatography (174 ± 60 nm)³¹ or cryoEM (140 ± 20 nm)⁴² and also to the measured sizes of complete HIV-1 (119-207 nm)^{41,43,44}. Furthermore, an advanced optical trapping approach for fluorescent HIV-1 using optical tweezers showed that aggregation of two viruses rarely occurred for concentrations $\leq 4 \times 10^7$ VLPs/mL, suggesting a low probability of aggregation when studying virus production of single cells.

A viro-fluidic system for real-time analysis of virus production kinetics from a single cell

The sensitivity of our virometry system allowed us to measure viral particle production at the single-cell scale. To record and quantify live virus egress from a single cell, a chip that combines cell capture and virus detection was needed. There is an extensive literature on single-cell trapping, mainly for intracellular analyses, demonstrating that PDMS device is a suitable system for cell culture and that immobilization does not alter cell properties^{1,2,14,20,45-48}. To analyse the VLP produced from each individual cell, we took advantage of the flow to separate and move the newly formed fluorescent VLPs away from the fluorescent producing cells. To this end, the cell-trap channel was directly connected to the virus-detection channel. Here we implemented the detection system with h: ~4 µm to benefit from a sensitive detection in a wide flow speed range. Since the field of view of our imaging system allowed two detection channels to be viewed simultaneously, we designed a chip with several parallel channels (Fig. 2B,C). Channel multiplication (10 cell trapping channels individually

connected to 10 virus detection channels) increases the probability of trapping two productive cells (green and alive) contiguously since the cell samples perfused into the chip contained non-fluorescent cells (~20%) and also reduces the hydrodynamic resistance in the sensing area. Although after a few hours of analysis, the study of additional cells could be undertaken by shifting the microscope stage to other channels, in general we analyzed 2 cells per cell sample per day. Throughout the experiment, the cells were perfused with a conditioned medium which mimics the environment of the cell population. It contains metabolites, growth factors and extracellular matrix proteins secreted by the cell population. A fluorescent marker (PI) was also added to the medium to monitor cell viability.

As with the virometry chip and based on the system of Eqs. 7 and 8 ($\delta 1 = 0.56$), the external pressure was optimized so that the average speed of the released particles did not exceed the detection threshold of 300 $\mu\text{m/s}$ and to avoid cross-contamination by the cells at the inlet I2. The Fig. 4A shows two HeLa cells immobilized for several hours in adjacent channels. The pressures P1, P2, P7 and P8 (Fig. 2C) were fixed to 7.9, 5.5, 0 and 5.5 mbar, respectively, when $v_{5i} = 250 \pm 18 \mu\text{m/s}$ (Movie S3). Next, application of the law of flow rate conservation allowed us to estimate the average speed in the trapping channel, $v_{4i} = 239 \pm 17 \mu\text{m/s}$. Importantly, all VLPs produced by a trapped cell were transported to their respective detection channel. Experimentally, inspection of the channel with empty trap adjacent to that of Cell1 revealed the absence of VLP contamination that could originate from Cell2 or the I2 inlet (cells perfusion) (Fig. 2B). This was also ensured by the regularity of the flow near the trapped cell. The evolution of streamlines in the vicinity of a trapped 17 μm bead was simulated with Comsol and no local recirculation flow appeared when $v_{4i} = 239 \mu\text{m/s}$. One example for one XY section plane at $z = 8.5 \mu\text{m}$ is given in Fig. 4B. The streamlines speed around a trapped cell and the shear stress are displayed in Fig. S4A,B. The simulation showed a maximal shear rate of 1000 s^{-1} which corresponded to a shear stress (τ) = 1 Pa (Fig. S4A). This value is close to physiological conditions since circulatory lymphocytes or endothelial cells in blood capillaries (d: 10 μm) undergo a maximal shear stress of 1.33 and 0.72 Pa, respectively 49. In addition, the trapped cells remained intact after 3h of immobilization (Fig. 4A). Cell viability was also monitored at different pressures by using PI staining. As shown in Fig. S5, cells were dying when $P1 > 25.5 \text{ mbar}$ and $\tau > 3.8 \text{ Pa}$. Extensive Comsol simulations allowed 3D-view of the shear rates around 17 μm and 10 μm

beads that mimicked HeLa nucleus when a cell was fully spread (Fig. S6A) 50. Simulations also allowed the evaluation of the additional hydrodynamic resistance in the trapping channel due to the presence of the pillars with or without cell (Fig. S6 B). By adding in the system of Eqs. 7 and 8 the value corresponding to an adherent cell ($\delta 1' = 0.28$), we predicted $v_{4i} = 206 \mu\text{m/s}$ and $v_{5i} = 217 \mu\text{m/s}$.

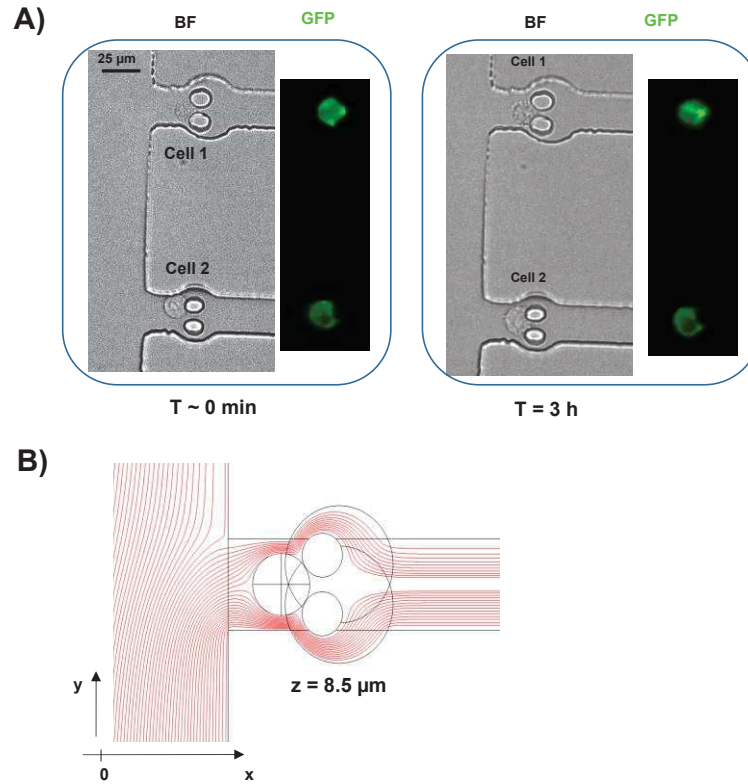


Figure 4: Single cell trapping in the viro-fluidic chip. (A) Representative image of two productive green single cells captured in two adjacent channels. Cells were imaged in BF and GFP (40x objective) at 1 min before looking at the detection channel and starting the recording session ($T = 0 \text{ min}$) and after 3 h of videos recording. (B) Comsol simulation of streamlines at $z = 8.5 \mu\text{m}$ in the vicinity of a $17 \mu\text{m}$ trapped bead when the average flow speed in the trapping channel (v_{4i}) was $239 \mu\text{m/s}$. No local looping of streamlines was observed, ensuring the absence of contamination between the 10 parallel trapping channels.

Once a single cell was trapped, real-time analysis of released VLPs began at the sensing channel. The fluorescent particles were monitored for at least 1 hour and 3-min movies were analysed frame by frame (Movie S3). First, viral production of fifteen single HeLa cells from ≥ 10 cell samples taken on different days from the same monoclonal line (Fig. 1) were analysed to assess the reproducibility of the system. As an example, the production at a given time of Cell1 and Cell2 of Fig. 4A are shown in Fig. 5A and a representative kinetic plot with the number of VLPs detected every 30 s

(arbitrary step) is shown in Fig. 5B. The interruptions in the recording of Cell1 or Cell2 production were due to several inspections of the trapped cell and the different channels of the chip. During the 4h of recording, there was no reflux, no interchannel contamination of VLPs, and no VLP adhesion to surfaces, whereas 207 VLPs were detected in the two sensing channels of Cell1 and Cell2. An average production rate of 41 ± 4 VLPs/h/cell was determined (Fig. 5C). The variation between measurements (11%) should correspond to the cell heterogeneity. The variation was similar when only 10 cells were considered, indicating that statistically, analysis of 15 cells was sufficient. In parallel, a global estimation of the viral production of a population of the same cells was performed. The VLP-containing medium of a plate of monoclonal HeLa cells, cultured for 5h, was analysed by the virometry chip and/or by NTA and the producing cells were trypsinized and counted (see Materials and Methods). The viral production per hour and by cell calculated from this cell population gave an average rate of 53 ± 8 VLPs/h/cell (Fig.5D) which was comparable to that obtained with individual cells. Overall, these results indicate that trapping and flow did not interfere with the viral production of the cell, that the viro-fluidics measurements were not affected by contaminating cells or VLPs, and that all viral particles released from the trapped cell were carried and detected efficiently in the detection channel. These data demonstrate the reliability of our viro-fluidic system.

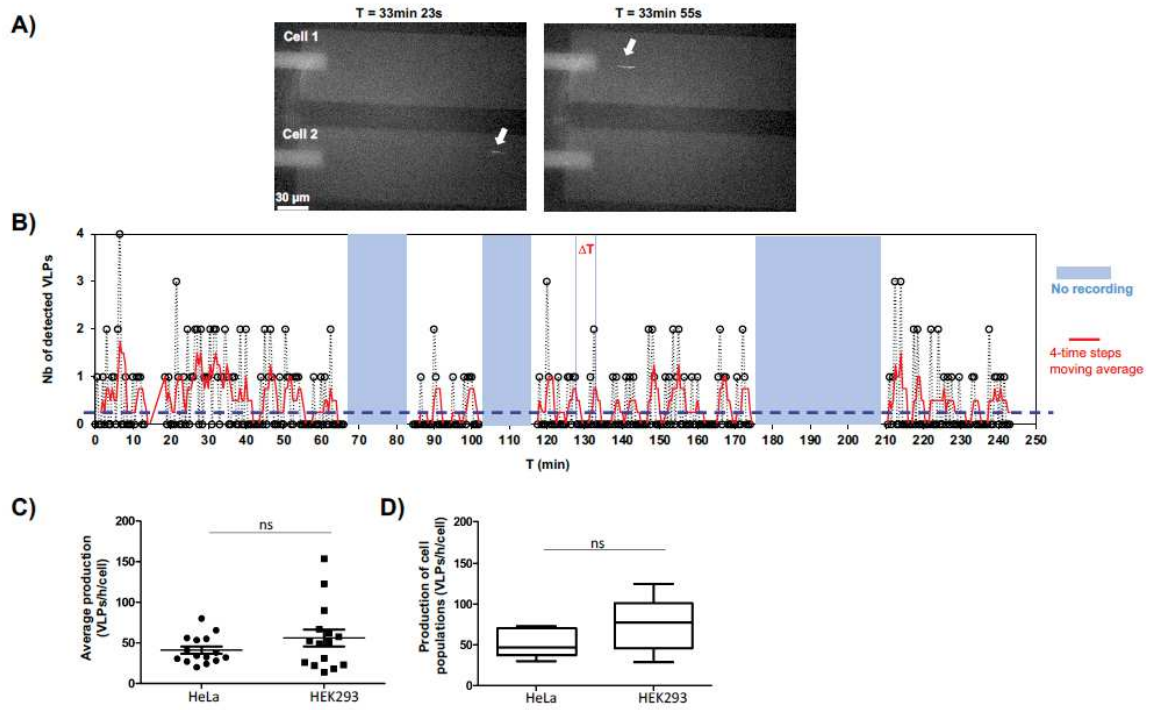


Figure 5: Live detection of viral production of single cells. (A) Images showing the passage through the detection channel ($w = 100\mu\text{m}$) of VLPs released from the two cells of Fig. 4A. The pressures P1, P2, P7 and P8 (see Fig. 2C) were set at 7.9, 5.5, 0 and 5.5 mbar, respectively. The average speed of VLPs in the detection channel was $v_{\text{si}} = 250\mu\text{m/s}$. (B) Number of VLPs detected every 30 s for the Cell 1 in Fig. 4A. T0 was the start of the recording. The dotted blue line indicated the threshold set at 0.25, due to the 4-steps moving average ($1/4$). The red line represents the moving average for continuous times of 4 steps and the representative time interval between 2 peaks, ΔT , was also noted in red. The dotted blue line indicates the threshold set at 0.25. The non-recording intervals (in blue) correspond to the inspection of captured cells to check their viability or of other channels to ensure the absence of reflux or virus contamination. (C) Average productions of VLPS released from individual cells ($n = 15$). Groups were compared using the Student t-test; ns: non-significant ($p = 0.19$). (D) VLP productions determined from respective cell populations grown in tissue-culture dishes ($n = 5$, $p = 0.19$).

Viro-fluidics was also used to study the viral production rate and kinetics of VLP release from the human HEK293 cell line, another model classically used to study HIV biogenesis. This time, a polyclonal cell line was used (Fig.1) to get a broader view of the cell-to-cell variation of viral production. As above, the viral production of fifteen individual cells were studied and an average rate of production was determined (56 ± 10 VLPs/h/cell) (Fig.5C). The kinetics were similar to those obtained with HeLa cells with a higher variation of production rate (18%) as expected for a polyclonal cell-line. For comparison, an overall estimate from the polyclonal HEK293 population, cultured 5h in culture dish, gave an average rate of 78 ± 16 VLPs/h/cell (Fig. 5D). This value was similar to that obtained for the average of the individual cells (Fig. 5C). This rate was 3-fold higher than the VLP productivity determined by NTA by Gonzalez-Dominguez et al. with HEK293 cells transiently expressing HIV-1 Gag-GFP during 72h

30. The difference between the expression systems used could explain this discrepancy. In the end, both cell types, HeLa and HEK293, showed similar viral production kinetics, suggesting the use of similar mechanisms of biogenesis and release of viral particles.

Interestingly, the kinetics profiles of the single-cell production appear non-regular (Fig.5B). A detailed examination of moving average at 4-time steps (2 min) indicates a quasi-periodic release that revealed for the first time the non-monotonic production ("bursts") of VLPs by a single cell. Periods of highest productivities (ΔT) were identified for 15 cells of each cell type (corresponding on average to 450 periods identified for each cell type). Note that the periods of viral release kinetics were shorter with larger amplitudes during the first hour of cell residence in the chip for all cells (e.g. by inspecting the red line for Cell1 in Fig. 5B). These initial bursts correspond to the time of cell adhesion as seen under the microscope. The curvature of the membrane of non-adherent cells reduces the energy barrier for Gag assembly, thus facilitating virus egress 51,52. Also, Gag synthesis might be stimulated in cells freshly detached by the trypsin from the culture dish 53. Because viral production (VLPs/h) varied over time, it was recalculated in short intervals of 0.5-1 h; then, for the same time intervals, ΔT averages were calculated and plotted against viral production (Fig. 6).

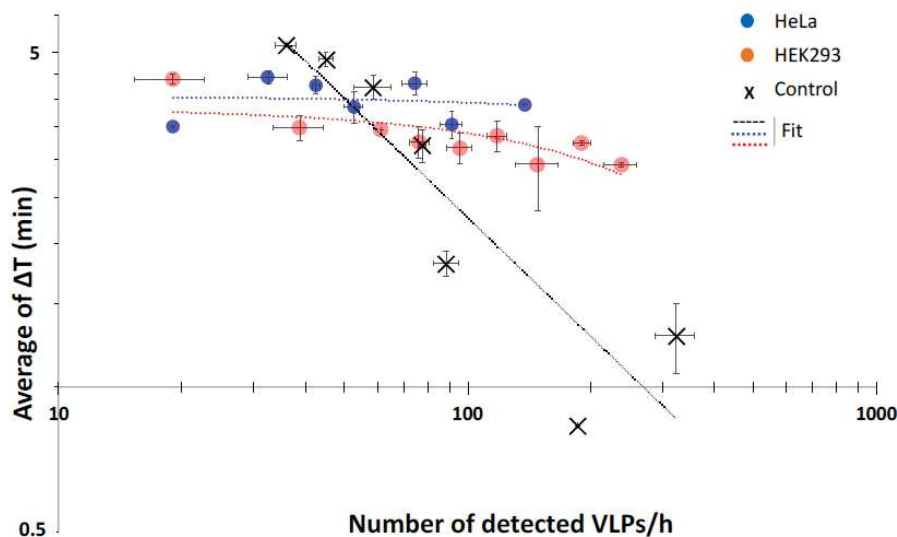


Figure 6: Analysis of viral production timescales. Average of ΔT was plotted as a function of the number of detected VLPs per hour. ΔT was averaged for periods of 0.5-1h. The horizontal error bars for the control were the results of independent experiments. In the case of VLP-producing cells, the data of production rate were regrouped in bins within a maximal interval of 43 VLPs/h. Then, the horizontal error bars were established within these intervals. For vertical error bars the s.e.m. was applied ($n = 15$ for each cell type and $n = 15$ for control). The black dotted line corresponds to power law fit $y = a * x^b$, with $a = 101.19$ and $b = -0.85$ ($R^2 = 0.81$). This behavior differs strongly from that of the single VLP-producing cells (red and blue dotted fitting lines).

The periods (ΔT) were fluctuating around 3.8-4 min for HeLa and HEK293 cells, respectively (Fig. 6). To test whether these periods could arise from the distribution of nanoparticles in the microfluidic flow, control experiments were conducted with VLPs not produced by the trapped cells. Viral stocks, at different concentrations ($2\text{--}20 \times 10^5$ VLPs/mL), were directly injected into the chip in the absence of producer cells in the traps. Then, VLP detection was conducted by using the same experimental conditions and pressures as for the producer cells. The control data showed a significantly different behaviour with respect to producing cells. This behavior could be qualitatively explained by relating the average $\Delta T \sim 1/(cQ)$ (which was derived from Eq. 9 with $N_p = 1$) to the number of detected VLPs/h given by $1h/\Delta T$ (Fig. 6). These results showed a qualitative and quantitative difference between the viral release from the cells and the control system in which periods ΔT were determined solely by flow properties and not by the biological process. The burst of virion produced indicates the presence of limiting step(s) in the virus formation mechanism. Interestingly, this time period (~ 4 min) was within the reported time range for transcriptional pausing 54,55, which could lead to a periodic supply of Gag proteins for virus assembly and release that also takes minutes 29. Further extensive research must be undertaken to understand the mechanism(s) responsible for these bursts. Viral burst production was unanticipated, since optimal strategy for a virus could be to reproduce as quickly as possible with a production that increases gradually over time. However, maximal rate might not be the optimal strategy when the immune response may kill the cell. This study highlights the importance of single-cell virology in improving the understanding of the molecular and cellular basis of virus-host interactions.

Conclusions

Here, we developed a simple and sensitive technique employing hydrodynamic cell trapping in a narrow individual microchannel allowing the live quantification of viral release in the extracellular medium at the single-cell and single-particle scales. The present study revealed the rate, frequency, and kinetics of HIV-1 VLP release from a single cell and uncovered an unexpected mechanism of burst release. Bursts would have been masked in population-scale experiments or in an uncoupled strategy in which viruses must be harvested at long time intervals (30 min) 56.

It would have been interesting to compare these new data with the literature on HIV infection in patients. Unfortunately, limited and conflicting quantitative studies in vivo have estimated that one infected T-cell produces between 500 to 4000 viruses during its lifetime 57,58. To our knowledge, there are no more precise experimental data available in the literature.

Viro-fluidics will open new avenues in our understanding of the dynamics of virus egress and will allow the analysis of the cellular and viral factors involved. In the future, several cell-lines will be studied providing new information on the adaptive strategies of HIV-1 production to its host. To date, these data are missing because they are inaccessible by conventional approaches.

The applications of viro-fluidics are numerous. Indeed, viro-fluidics is not only dedicated to HIV but also allows the study of different viral diseases such as other pandemic viruses. Since it is applicable to body fluids, it allows for the first time to study the biogenesis, the release pathway, and the propagation of these pathogens within the host environment.

References

- 1 Huang, N.-T., Zhang, H.-I., Chung, M.-T., Seo, J. H. & Kurabayashi, K. Recent advancements in optofluidics-based single-cell analysis: optical on-chip cellular manipulation, treatment, and property detection. *Lab on a Chip* **14**, 1230-1245, doi:10.1039/C3LC51211H (2014).
- 2 Narayanamurthy, V., Nagarajan, S., Khan, A. a. Y. F., Samsuri, F. & Sridhar, T. M. Microfluidic hydrodynamic trapping for single cell analysis: mechanisms, methods and applications. *Analytical Methods* **9**, 3751-3772, doi:10.1039/C7AY00656J (2017).
- 3 Mazutis, L. *et al.* Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc* **8**, 870-891, doi:10.1038/nprot.2013.046 (2013).
- 4 Ciuffi, A., Rato, S. & Telenti, A. Single-Cell Genomics for Virology. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8050123 (2016).
- 5 Liu, W., He, H. & Zheng, S. Y. Microfluidics in Single-Cell Virology: Technologies and Applications. *Trends Biotechnol* **38**, 1360-1372, doi:10.1016/j.tibtech.2020.04.010 (2020).
- 6 Chaipan, C. *et al.* Single-Virus Droplet Microfluidics for High-Throughput Screening of Neutralizing Epitopes on HIV Particles. *Cell Chem Biol* **24**, 751-757 e753, doi:10.1016/j.chembiol.2017.05.009 (2017).
- 7 Jaitin, D. A. *et al.* Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* **343**, 776-779, doi:10.1126/science.1247651 (2014).
- 8 Prakadan, S. M., Shalek, A. K. & Weitz, D. A. Scaling by shrinking: empowering single-cell 'omics' with microfluidic devices. *Nat Rev Genet* **18**, 345-361, doi:10.1038/nrg.2017.15 (2017).
- 9 Streets, A. M. *et al.* Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7048-7053, doi:10.1073/pnas.1402030111 (2014).
- 10 Guo, F. *et al.* Single-Cell Virology: On-Chip Investigation of Viral Infection Dynamics. *Cell Rep* **21**, 1692-1704, doi:10.1016/j.celrep.2017.10.051 (2017).
- 11 Akpinar, F., Timm, A. & Yin, J. High-Throughput Single-Cell Kinetics of Virus Infections in the Presence of Defective Interfering Particles. *J Virol* **90**, 1599-1612, doi:10.1128/JVI.02190-15 (2016).
- 12 Warrick, J. W., Timm, A., Swick, A. & Yin, J. Tools for Single-Cell Kinetic Analysis of Virus-Host Interactions. *PLoS One* **11**, e0145081, doi:10.1371/journal.pone.0145081 (2016).
- 13 Shafiee, H. *et al.* Emerging technologies for point-of-care management of HIV infection. *Annu Rev Med* **66**, 387-405, doi:10.1146/annurev-med-092112-143017 (2015).
- 14 Ramji, R., Wong, V. C., Chavali, A. K., Gearhart, L. M. & Miller-Jensen, K. A passive-flow microfluidic device for imaging latent HIV activation dynamics in single T cells. *Integr Biol (Camb)* **7**, 998-1010, doi:10.1039/c5ib00094g (2015).

- 15 Powell, L. *et al.* Rapid and sensitive detection of viral nucleic acids using silicon microchips. *Analyst* **143**, 2596-2603, doi:10.1039/C8AN00552D (2018).
- 16 Ouyang, W. & Han, J. Universal amplification-free molecular diagnostics by billion-fold hierarchical nanofluidic concentration. *PNAS* **116**, 16240-16249, doi:10.1073/pnas.1904513116 (2019).
- 17 Yucha, R. W. *et al.* High-throughput Characterization of HIV-1 Reservoir Reactivation Using a Single-Cell-in-Droplet PCR Assay. *EBioMedicine* **20**, 217-229, doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.006 (2017).
- 18 Golumbeanu, M. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptional Heterogeneity in Latent and Reactivated HIV-Infected Cells. *Cell Rep* **23**, 942-950, doi:10.1016/j.celrep.2018.03.102 (2018).
- 19 Rato, S., Rausell, A., Munoz, M., Telenti, A. & Ciuffi, A. Single-cell analysis identifies cellular markers of the HIV permissive cell. *PLoS Pathog* **13**, e1006678, doi:10.1371/journal.ppat.1006678 (2017).
- 20 Eid, J., Mougél, M. & Socol, M. Advances in Continuous Microfluidics-Based Technologies for the Study of HIV Infection. *Viruses* **12**, 982, doi:10.3390/v12090982 (2020).
- 21 Dirk, B. S., Van Nynatten, L. R. & Dikeakos, J. D. Where in the Cell Are You? Probing HIV-1 Host Interactions through Advanced Imaging Techniques. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8100288 (2016).
- 22 Gottlinger, H. G. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15 Suppl 5**, S13-20 (2001).
- 23 Lavado-Garcia, J. *et al.* Characterization of HIV-1 virus-like particles and determination of Gag stoichiometry for different production platforms. *Biotechnol Bioeng* **118**, 2660-2675, doi:10.1002/bit.27786 (2021).
- 24 Tohidi, F., Sadat, S. M., Bolhassani, A. & Yaghobi, R. Construction and Production of HIV-VLP Harboring MPER-V3 for Potential Vaccine Study. *Curr HIV Res* **15**, 434-439, doi:10.2174/1570162X15666171017122229 (2017).
- 25 Chamontin, C. *et al.* HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Res* **43**, 336-347, doi:10.1093/nar/gku1232 (2015).
- 26 Ferrer, M. *et al.* Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkw511 (2016).
- 27 Ivanchenko, S. *et al.* Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLoS Pathogens* **5**, e1000652, doi:10.1371/journal.ppat.1000652 (2009).
- 28 Jouvenet, N., Bieniasz, P. D. & Simon, S. M. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* **454**, 236-240, doi:10.1038/nature06998 (2008).
- 29 Bednarska, J. *et al.* Rapid formation of human immunodeficiency virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 21637-21646, doi:10.1073/pnas.2008156117 (2020).
- 30 Gonzalez-Dominguez, I., Puente-Massaguer, E., Cervera, L. & Godia, F. Quantification of the HIV-1 virus-like particle production process by super-resolution imaging: From VLP budding to nanoparticle analysis. *Biotechnol Bioeng* **117**, 1929-1945, doi:10.1002/bit.27345 (2020).
- 31 Steppert, P. *et al.* Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis. *Journal of Chromatography A* **1487**, 89-99, doi:10.1016/j.chroma.2016.12.085 (2017).
- 32 Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P. & Thali, M. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**, 902-910 (2003).
- 33 Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181-189, doi:10.1038/nature13118 (2014).
- 34 Bruus, H. *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press edn, (2007).
- 35 Fouet, M. *et al.* Filter-less submicron hydrodynamic size sorting. *Lab Chip*, 720-733 (2016).
- 36 Liot, O. *et al.* Transport of nano-objects in narrow channels: influence of Brownian diffusion, confinement and particle nature. *J Phys Condens Matter* **30**, 234001, doi:10.1088/1361-648X/aac0af (2018).
- 37 Li, N. *et al.* Photonic resonator interferometric scattering microscopy. *Nature Communications* **12**, 1744, doi:10.1038/s41467-021-21999-3 (2021).
- 38 Brittain, G. C. t. *et al.* A Novel Semiconductor-Based Flow Cytometer with Enhanced Light-Scatter Sensitivity for the Analysis of Biological Nanoparticles. *Sci Rep* **9**, 16039, doi:10.1038/s41598-019-52366-4 (2019).
- 39 Renner, T. M., Tang, V. A., Burger, D. & Langlois, M. A. Intact Viral Particle Counts Measured by Flow Virometry Provide Insight into the Infectivity and Genome Packaging Efficiency of Moloney Murine Leukemia Virus. *J Virol* **94**, doi:10.1128/JVI.01600-19 (2020).
- 40 Zamora, J. L. R. & Aguilar, H. C. Flow virometry as a tool to study viruses. *Methods* **134-135**, 87-97, doi:10.1016/j.ymeth.2017.12.011 (2018).
- 41 Pang, Y., Song, H., Kim, J. H., Hou, X. & Cheng, W. Optical trapping of individual human immunodeficiency viruses in culture fluid reveals heterogeneity with single-molecule resolution. *Nature Nanotechnology* **9**, 624-630, doi:10.1038/nnano.2014.140 (2014).
- 42 Deml, L., Speth, C., Dierich, M. P., Wolf, H. & Wagner, R. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Molecular Immunology* **42**, 259-277, doi:10.1016/j.molimm.2004.06.028 (2005).
- 43 Briggs, J. A. G. *et al.* The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 672-675, doi:10.1038/nsmb785 (2004).
- 44 Gonzalez-Dominguez, I., Gutierrez-Granados, S., Cervera, L., Godia, F. & Domingo, N. Identification of HIV-1-Based Virus-like Particles by Multifrequency Atomic Force Microscopy. *Biophys J* **111**, 1173-1179, doi:10.1016/j.bpj.2016.07.046 (2016).
- 45 Timm, A. C., Warrick, J. W. & Yin, J. Quantitative profiling of innate immune activation by viral infection in single cells. *Integr Biol (Camb)* **9**, 782-791, doi:10.1039/c7ib00082k (2017).

- 46 Liu, W. *et al.* More than efficacy revealed by single-cell analysis of antiviral therapeutics. *Sci Adv* **5**, eaax4761, doi:10.1126/sciadv.aax4761 (2019).
- 47 Chen, H., Sun, J., Wolvetang, E. & Cooper-White, J. High-throughput, deterministic single cell trapping and long-term clonal cell culture in microfluidic devices. *Lab on a Chip* **15**, 1072-1083, doi:10.1039/C4LC01176G (2015).
- 48 Lin, J. *et al.* Ultra-sensitive digital quantification of proteins and mRNA in single cells. *Nat Commun* **10**, 3544, doi:10.1038/s41467-019-11531-z (2019).
- 49 Dupire, J., Socol, M. & Viallat, A. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20808-20813, doi:10.1073/pnas.1210236109 (2012).
- 50 Szczurek, A. *et al.* Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus (Austin, Tex.)* **5**, doi:10.4161/nucl.29564 (2014).
- 51 Martinac, B. *et al.* Cell membrane mechanics and mechanosensory transduction. *Curr Top Membr* **86**, 83-141, doi:10.1016/bs.ctm.2020.08.002 (2020).
- 52 Inamdar, K. *et al.* Full assembly of HIV-1 particles requires assistance of the membrane curvature factor IRSp53. *Elife* **10**, doi:10.7554/eLife.67321 (2021).
- 53 Mallucci, L., Wells, V. & Young, M. R. Effect of trypsin on cell volume and mass. *Nat New Biol* **239**, 53-55, doi:10.1038/newbio239053a0 (1972).
- 54 Henriques, T. *et al.* Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes & Development* **32**, 26-41, doi:10.1101/gad.309351.117 (2018).
- 55 Tantale, K. *et al.* Stochastic pausing at latent HIV-1 promoters generates transcriptional bursting. *Nat Commun* **12**, 4503, doi:10.1038/s41467-021-24462-5 (2021).
- 56 Timm, A. & Yin, J. Kinetics of virus production from single cells. *Virology* **424**, 11-17, doi:10.1016/j.virol.2011.12.005 (2012).
- 57 Haase, A. T. *et al.* Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* **274**, 985-989, doi:10.1126/science.274.5289.985 (1996).
- 58 Hockett, R. D. *et al.* Constant mean viral copy number per infected cell in tissues regardless of high, low, or undetectable plasma HIV RNA. *J Exp Med* **189**, 1545-1554, doi:10.1084/jem.189.10.1545 (1999).

Acknowledgements

We are grateful to the Montpellier MRI imaging staff for technical assistance for microscopy and FACS. We thank the staff of the IES clean room for their assistance with special thanks to Dr. F. Pichot. Many thanks to Dr. J. Chopineau and Dr. M. Morille for their expertise in NTA experiments and to C. Motto-Ros, trainee, for technical help. J. E. is supported by a fellowship from Infectiopole Sud. This study was supported by grants of the French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis (ANRS) to M.M, B.C and E.M, the CNRS-Osez L'Interdisciplinarité to M.M, and the French National Research Agency (ANRJC) to M. S. MRI and the CBS belong to the France-BioImaging national infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, "Investments for the future").

Author contribution

MM conceptualized the study, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript with the help of MS. JE and MS conducted the experiment with technical help of JF, analyzed and interpreted the data. BC and MS designed the chips and BC, MS and JE fabricated the devices. AN performed the simulations. EM and LC

contributed to the microscopy, the video analysis, and the mathematical analysis and data interpretation. All authors supervised and revised the manuscript.

Additional Information

Supplementary Material

MovieS1. Fluorescence microscopy for the detection of VLPs in *Sample1* (diluted 3 times) by using the 3.7 μm high detection chip. The movie duration is 18.85 s with 7 virions detected per frame-by-frame analysis. The average flow speed is 55 $\mu\text{m/s}$ and the average concentration of the sample is $1.52 \pm 0.1 \times 10^7$ VLPs/mL.

MovieS2. Fluorescence microscopy for the detection of VLPs in *Dilution1000* sample using a 6.7 μm high detection chip. The movie duration is 9.45 s with 1 VLP detected. The average flow speed is 39 $\mu\text{m/s}$ and the average concentration of the sample is $1.36 \pm 0.4 \times 10^4$ VLPs/mL.

MovieS3. Fluorescence microscopy for real-time detection of VLPs released by single cells in the viro-fluidic chip. The film shows the production of the two cells in Fig. 4A analyzed for 2 min. Five and two VLPs were observed for Cell 1 and 2, respectively.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

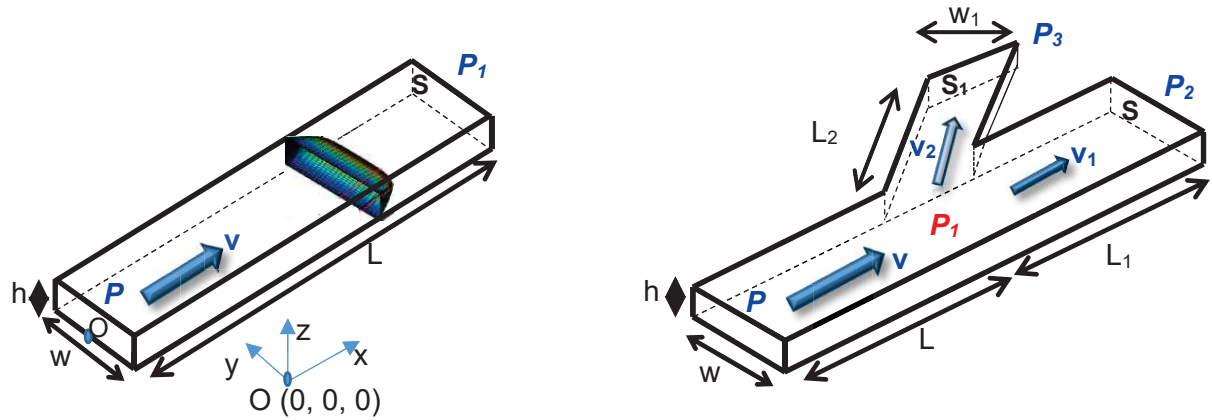


Figure S1: 3D diagrams of the flow distribution in the chips. The left panel illustrates the flow created by a positive pressure drop ($P-P_1$) in a rectangular channel of cross section ($S = h \cdot w$); the arrow indicates the flow direction. The average speed of the fluid (v) and the velocity profile obtained by Comsol simulation are shown. The Origin $O(0,0,0)$ of the axes is indicated by a blue dot. The right panel shows the flow distribution in a rectangular channel with one ramification (width, w_1 and cross section, S_1); the pressure drop inside the main channel is linear and internal pressure at the ramification point (P_1) is marked in red.

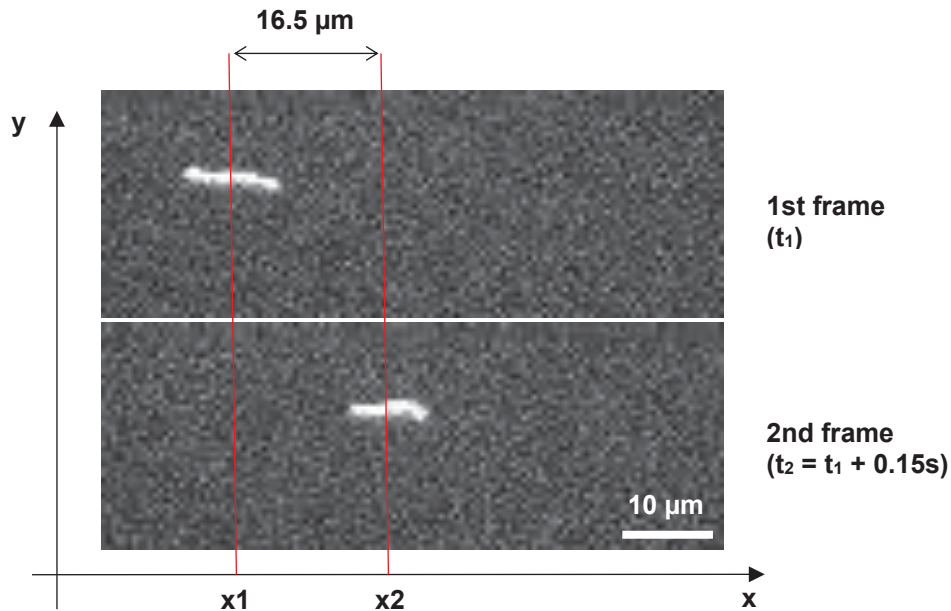
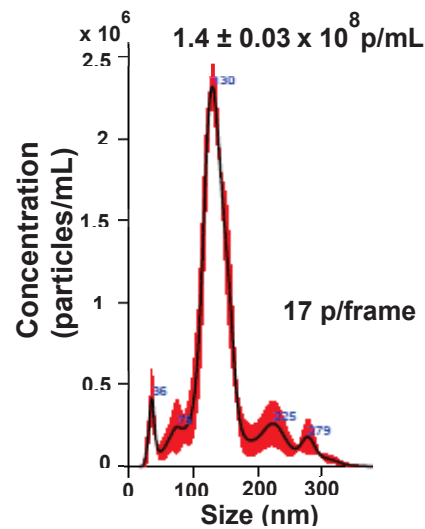
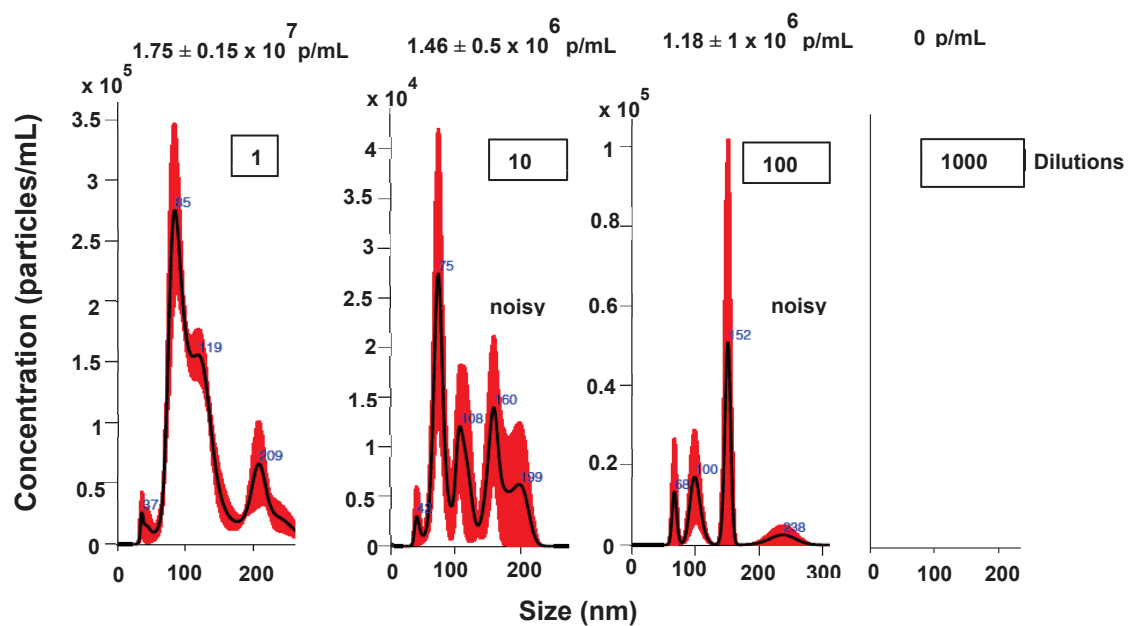


Figure S2: VLP speed. Calculation of the instantaneous speed of a VLP in the detection channel: $v_{\text{inst}} = (x_2 - x_1) / 0.15 = 110 \mu\text{m/s}$. Particle diffusion was neglected and the mass center of the VLP was approximated to the middle of fluorescent path recorded during 150 ms.

A)



B)



C)

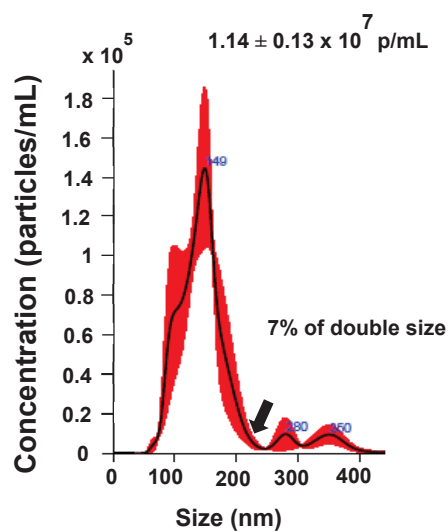
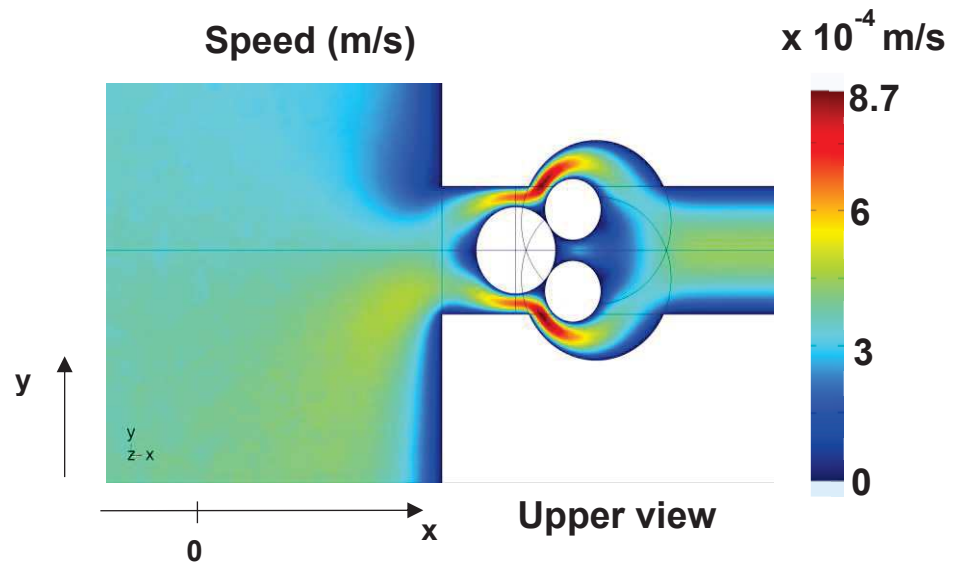


Figure S3: NTA analyses. For all samples the 488 nm filter was used. The mean concentration is indicated above each plot **A)** NTA plot of the concentrated sample (see Materials and Methods). The number of particles detected was 17 per frame. **B)** Dilution range. **C)** Sample size distribution of a sample at concentration: $1.14 \pm 0.13 \times 10^7$ particles/mL.

A)



B)

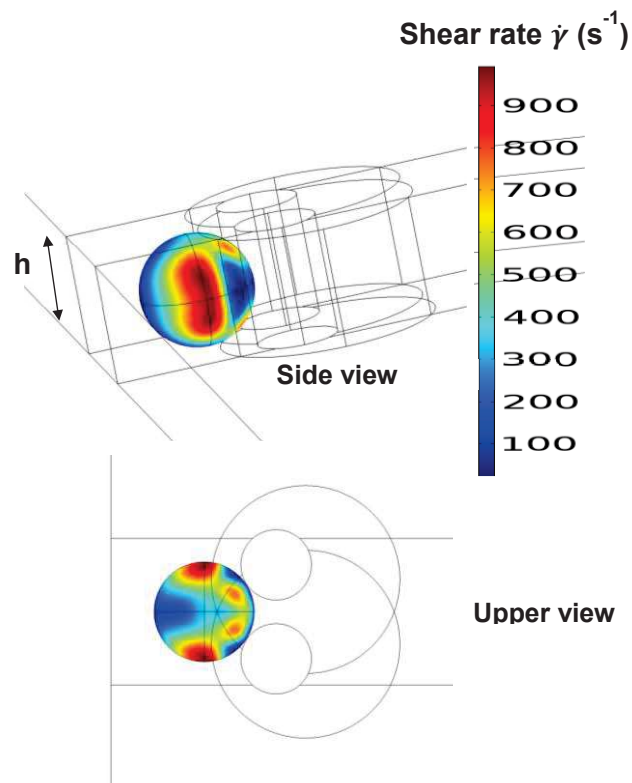


Figure S4: Comsol simulation of single cell trapping in the viro-fluidic chip. A) Upper view of the Comsol simulation with speed of the streamlines when $v_{4i} = 239 \mu\text{m/s}$. **B)** In order to mimic the shear stress ($\tau = \dot{\gamma} \cdot \eta$) that a cell might experience before spreading on glass, simulations of shear rate ($\dot{\gamma}$) around a $17 \mu\text{m}$ sphere were performed. The maximum τ was 1.03 Pa . The symmetry of the shear stress distribution can be seen in the upper view.

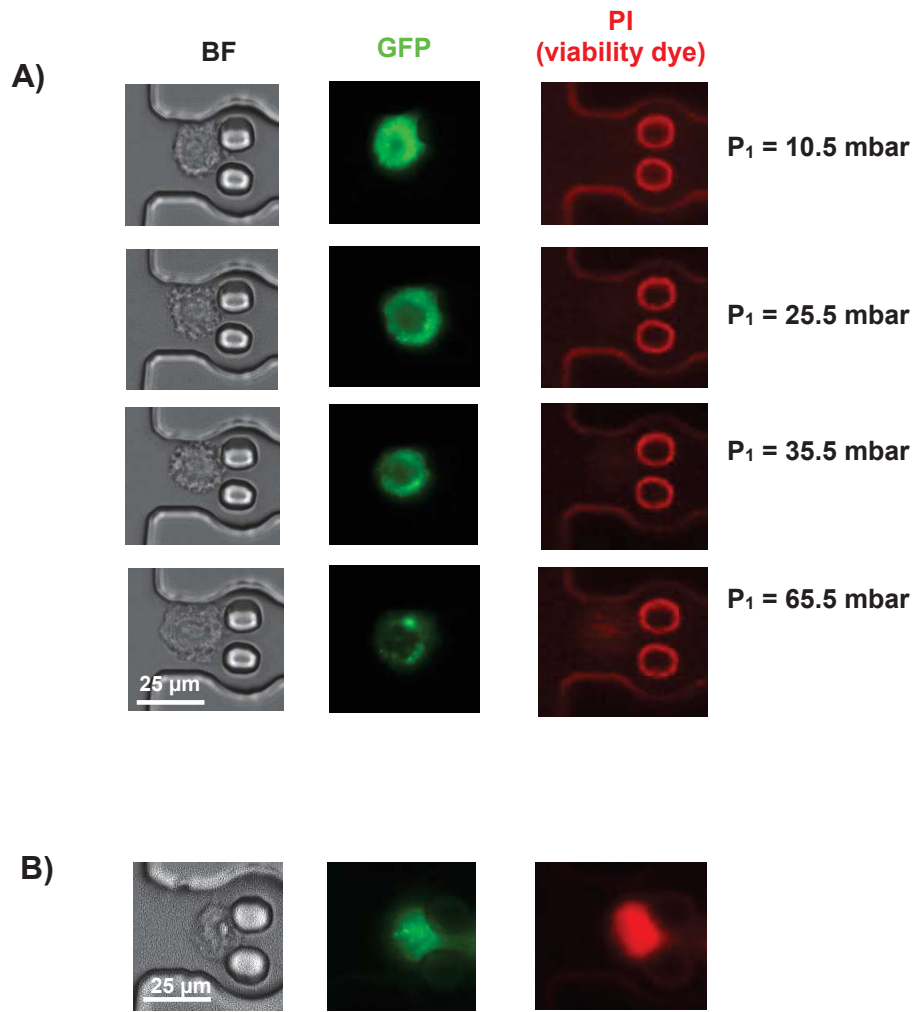


Figure S5: Effect of pressure on the captured HeLa cell. A) Cell morphology was observed in bright field (BF) while VLP production and cell viability were monitored in GFP and Cherry filters, respectively. In each case, the pressure was maintained for 15 min. For $P_1 > 35.5$ mbar, membrane shear allowed PI dye penetration. Significant deformation of the cell membrane was observed at $P_1 = 65.5$ mbar. P_2 , P_7 and P_8 were fixed to 5.5, 0 and 5.5 mbar, respectively. **B)** Dead cell stained with PI. $n = 3$.

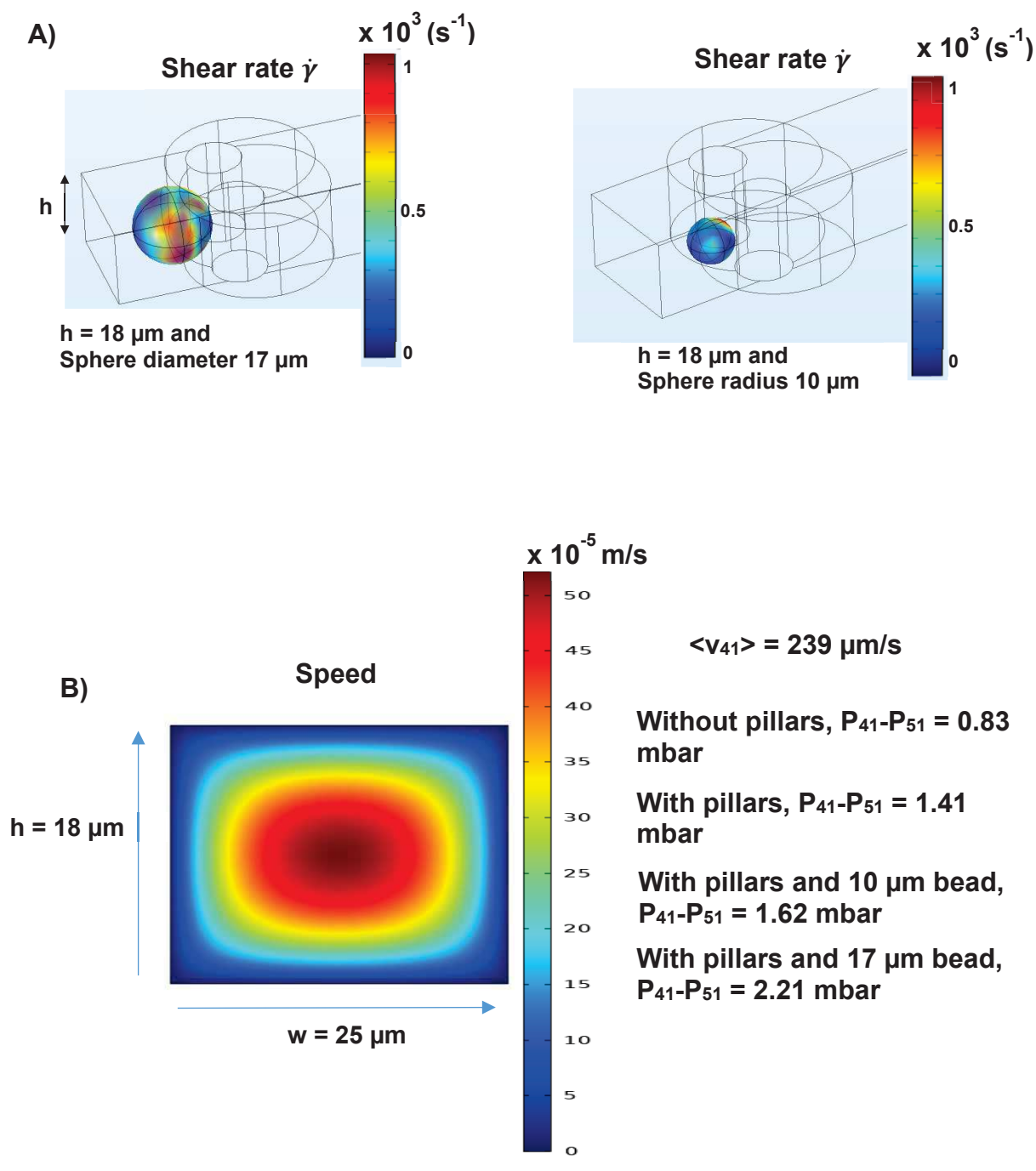


Figure S6: Comsol simulations. **A)** 3D view of shear rate simulations around a $17 \mu\text{m}$ (left) or $10 \mu\text{m}$ (right) bead in a trap. **B)** Speed of streamlines positioned $275 \mu\text{m}$ downstream of a trap. The average speed in the channel was set at $239 \mu\text{m/s}$ (same as in Fig. 4). For the same average speed, significant variations in hydrodynamic resistance were found when pillars and beads (17 or $10 \mu\text{m}$) were present in the channel (right).

Discussion et Perspectives

Nombreux sont les systèmes microfluidiques qui ont été développés pour la capture et l'analyse de cellules uniques. Plusieurs domaines de la biologie ont bénéficié de leur particularité à dévoiler l'hétérogénéité intercellulaire dont l'étude est inaccessible par les techniques réalisées avec des populations de cellules. Au cours des cinq dernières années, l'analyse de cellules uniques a connu un essor dans le domaine de la virologie (pour revue: (Liu et al., 2020)). Vu que la réplication des virus est fortement dépendante de la machinerie cellulaire, l'hétérogénéité entre les cellules induit une variation de la dynamique de l'infection virale. Ainsi, l'analyse sur de cellules uniques permet d'amender nos connaissances sur les interactions entre le virus et son hôte et de mieux comprendre les mécanismes biologiques.

La microfluidique est amplement appliquée à l'étude du VIH-1. De nombreux systèmes ont été développés aussi bien pour des applications cliniques que pour des études fondamentales (pour revue voir : (Eid et al., 2020)). Ces systèmes permettent l'étude approfondie des différentes étapes du cycle de réplication viral, partant de l'entrée du virus avec la fusion de l'enveloppe virale avec la MP de la cellule jusqu'à l'étape de relargage du virus avec la conception de systèmes de quantification des virus en solution. Par contre, à ce jour il n'y a pas de systèmes microfluidiques applicables pour l'étude en temps réel de la cinétique du relargage de virus à l'échelle de la cellule unique. De plus, les techniques de microscopie en temps réel qui sont largement utilisées pour l'étude des étapes tardives de réplication du VIH-1 présentent des difficultés pour la détection des virus libérés par la cellule. En effet, vu que le bourgeonnement et la libération ne génèrent pas de variations significatives de fluorescence des molécules Gag-GFP assemblées au niveau de la MP, il est difficile de les distinguer par le TIRFM (Jouvenet et al., 2008). De plus, le contact entre la cellule et la lamelle microscopique peut induire des changements au niveau de la MP qui affectent la dynamique de l'assemblage et du relargage. De plus, les virus produits s'ils ne sont pas entraînés par un flux, peuvent restés collés à la MP. Cependant, une étude récente de l'assemblage de VLPs fluorescents par la technique SICM-FCM au niveau de la surface supérieure d'une cellule adhérente a pu montrer que la durée de l'assemblage du VIH-1 à la MP était plus rapide (~4 min) que celle déterminée par TIRF (~8-10 min) (Bednarska et al., 2020). Ceci suggère que le contact cellule-lamelle contraint l'assemblage et le relargage viral. En revanche, cette technique ne permet pas une étude complète du relargage viral vu que des VLPs dérivent hors du champ de vision ce qui empêche une révélation précise du temps de relargage.

Il est important de développer une approche qui permet de détecter les virus libres en très faible concentration dans le milieu extracellulaire et de mesurer en temps réel leur relargage par la cellule afin de déterminer les paramètres cinétiques de la production virale. Ceci est réalisable par la conception d'un système sous flux continu qui permet le transport de virions loin de la cellule unique afin qu'ils puissent être détectés et quantifiés en temps réel sans contraintes imposées sur la cellule, qu'elles soient mécaniques ou optiques (bleaching, fort bruit de fond, etc.). Ainsi, le but de mon projet de thèse était d'appliquer la Microfluidique continue pour l'étude de la cinétique du relargage du VIH-1 à l'échelle de la cellule unique. Ceci nécessite la conception d'une puce microfluidique à double fonction : une capture d'une cellule unique en amont et une détection très sensible en aval des virions fluorescents relargués par la cellule piégée. Le défi est double, technique et biologique : il faut un dispositif simple à fabriquer et à utiliser par les biologistes et les données biologiques obtenues ne doivent pas être biaisées par le système microfluidique. Ces deux fonctions ont d'abord été mises au point de façon découplée, par commodité pour la prise en main mais aussi parce que nous pensons que les puces « simple fonction » (capture ou de détection de virus) sont des outils intéressants en soi pour d'autres projets.

- Capture cellulaire

La première puce que j'ai manipulé durant ma thèse est la puce de capture. Il s'agit d'un microcanal d'une hauteur 22 μm avec une entrée de perfusion du milieu, une entrée d'ensemencement des cellules et une sortie. Elle s'est avérée fonctionnelle et pourrait servir à des projets s'intéressant à des études intracellulaires, avec possibilité de faire varier facilement et rapidement l'environnement cellulaire. Nous avons vu que l'efficacité de la capture d'une cellule unique est assurée par plusieurs facteurs : la conception du piège (forme, emplacement), la concentration cellulaire ensemencée dans la puce et le maintien d'un reflux continu de l'entrée du milieu vers l'entrée des cellules durant toute la durée de l'expérience.

Nous avons vu qu'il était possible d'immobiliser la cellule sous un flux continu sans exercer de contraintes de cisaillements excessives sur la cellule. Les contraintes de cisaillement dépendent de la force exercée par le flux et de la structure du piège. Les simulations COMSOL faites avec une bille de 17 μm de diamètre révèlent une vitesse maximale du fluide de 1400 $\mu\text{m/s}$ à proximité du piège et de 500 $\mu\text{m/s}$ au

niveau de la région de restriction entre les deux plots du piège. Cette valeur correspond à celle obtenue par le calcul analytique et qui donne 530 $\mu\text{m/s}$. Le taux de cisaillement atteint son maximum au niveau de la MP et est égal à 250 s^{-1} . Les contraintes de cisaillement maximales correspondantes sont de l'ordre de 0,25 Pa. Cette valeur est inférieure à celle obtenue avec des cellules endothéliales dans les capillaires sanguins, qui est de l'ordre de 0,72 Pa (Dupire et al., 2012b). Les résultats montrent que l'immobilisation de la cellule s'effectue sous conditions physiologiques optimales. Ces valeurs sont caractéristiques de notre système de capture et peuvent varier d'un système à l'autre selon sa conception et ses dimensions. Par exemple, la réduction de la région de restriction entre les deux plots ou l'augmentation de la surface de contact entre la cellule et le piège exercent des contraintes de cisaillement plus importantes sur la cellule qui peuvent affecter par la suite son comportement. Une analyse cinétique pourrait également être envisagée avec ce type de puce mais avec des temps beaucoup plus espacés, avec par exemple la récupération du milieu à la sortie du canal chaque 30 min. Le contenu viral pourrait alors être quantifié à l'aide de notre puce de détection ou par différentes méthodes telles que ELISA, qRT-PCR ou NTA. Néanmoins, il se peut que dans le cas du VIH-1 la concentration de virions dans les échantillons ainsi collectés soit très faible. De plus, les volumes seront de l'ordre de dizaines de nL nécessitant un système de mesure de pointe à très forte sensibilité.

- Détection et quantification des virus en solution

Actuellement, plusieurs systèmes de quantification de virus sont disponibles mais qui s'adressent à des échantillons concentrés, par exemple des échantillons provenant de populations de cellules et non pas de cellules uniques. Outre le NTA que j'ai aussi utilisé lors de ma thèse, l'équipe de Dr. Langlois au Canada a adapté un cytomètre de flux à la quantification des particules virales à l'échelle de la particule unique. Leur technique présente une LOD de 80 à 10^8 particules/ml (Bonar and Tilton, 2017). En revanche, elle présente une variabilité des résultats qui dépend de la machine utilisée et des paramètres d'étalonnage fixés, et à ce jour elle n'a pas montré une application à l'échelle de la cellule unique. De son côté, le NTA présente une LOD entre 10^7 et 10^9 particules/ml. Dans ce contexte, notre puce de détection avec une LOD entre 10^5 et 10^8 virions / ml, soit 100x plus sensible que le NTA (**Tableau 5**),

s'avère précieuse et ouvre de nouveaux champs d'investigation. Notre système de quantification de virus à faible concentration, présente l'avantage d'être simple à utiliser pour un virologiste, peu coûteux, et permet une quantification des virus directement dans le milieu de culture des cellules, sans étape préalable de concentration par ultracentrifugation par exemple. Cependant, l'analyse des vidéos est fastidieuse pour des solutions très diluées. L'équipe s'intéresse au développement d'un système automatisé de comptage permettant une analyse plus rapide de telles solutions.

Critère \ Technique	Virométrie en puce de détection	NTA
Type + Dimensions	Microcanal h = 3.7 / 6.7 μm , w = 130 μm	Chambre microfluidique h = 50 μm , w = 1mm
Champ de détection	Toute la hauteur	10 μm
Type de détection	Fluorescence	Fluorescence + lumière diffusée
LOD (particules/ml)	$10^5 - 10^8$	$10^7 - 10^9$
Sensibilité (fonction de la limite de détection)	100 x plus sensible que le NTA (pour le même temps d'analyse)	-
Distribution de taille (VLPs-GFP)	81% virions uniques 19% double virions	93% virions uniques 7% double virions

Tableau 5: Comparaison entre notre virométrie en puce de détection et la technique NTA

En parallèle, nous collaborons avec une équipe de physiciens (ENS, Lyon) qui développe une autre approche de quantification de virus fluorescents par passage des virus dans des nanopores (voir annexe). Un film d'or déposé sous la membrane de polycarbonate permet d'intensifier le signal fluorescent lors de la sortie du virus par un effet Zero-Mode Waveguide (ZMW). Nous réfléchissons à l'inclusion de ces nanopores dans une puce microfluidique en aval du piège de cellule. La forte densité des nanopores sur la membrane ($10^8/\text{cm}^2$) faciliterait le débit du flux dans la puce et l'effet ZMW augmenterait la sensibilité de détection pour des virus faiblement fluorescents.

Deux puces de détection de hauteurs différentes 3,7 et 6,7 μm ont été testées pour leur sensibilité de détection à l'échelle de la particule unique. Etant donné que la sensibilité dépend fortement de la vitesse du flux définie par la différence de pression ΔP appliquée entre l'entrée et la sortie du microcanal, il est important de trouver un

compromis entre ces deux paramètres. Pour une même ΔP , plus la hauteur de la puce est grande plus le débit est important (dépendant de h^3) ce qui permet la quantification de nanoparticules dans des solutions diluées sur des durées plus courtes. La performance des deux puces est similaire pour des vitesses $< 150 \mu\text{m/s}$; par contre, le nombre de virions détectés dans le volume analysé est réduit si on dépasse cette vitesse car il se peut que des particules restent en dehors de la profondeur de champ de l'objectif utilisé et ne seront pas détectées en temps utile en traversant la longueur du champ de vision. Puisque la hauteur $3,7 \mu\text{m}$ représente presque le double de la profondeur de champ de l'objectif 40x elle reste plus fiable que la hauteur $6,7 \mu\text{m}$ pour une plage de vitesses plus large. A noter que l'intensité de la fluorescence n'était pas la même pour tous les virions, même quand ceux-ci étaient dans le plan focal. Ceci est peut-être dû à la variation du nombre des molécules Gag-GFP formant le virion (2000-4000) (Lavado-Garcia et al., 2021).

Outre la quantification, notre système permet également d'appréhender la taille des nanoparticules détectées. Les profils de distribution des tailles ont été comparés avec ceux du NTA. Pour cela nous avons utilisé une puce de détection de $10 \mu\text{m}$ de hauteur afin de minimiser les interactions hydrodynamiques entre le virion et les parois, ou en d'autre terme pour assurer une distance suffisante entre les deux parois pour que la particule diffuse librement. Le déplacement quadratique moyen des particules est calculé et leur diamètre est par la suite déduit. Nous avons trouvé 81% des virions qui correspondent à des particules uniques avec un diamètre $170 \pm 30 \text{ nm}$, et 19% avec un diamètre $280 \pm 50 \text{ nm}$ correspondant à des agrégats de particules. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le NTA mais avec un pourcentage plus faible d'agrégats (7%). Cette différence est peut-être due aux interactions hydrodynamiques entre les parois du microcanal et les particules, ce qui induit leur ralentissement et leur apparition avec une taille plus grande. Pour les particules uniques, la taille obtenue correspond aux tailles déterminées par d'autres techniques aussi bien pour les VLPs par chromatographie par exclusion de taille ($174 \pm 60 \text{ nm}$) (Steppert et al., 2017) et par Cryo-EM ($174 \pm 60 \text{ nm}$) (Deml et al., 2005) que pour le virus complet ($119 - 207 \text{ nm}$) (Briggs et al., 2004). Tous ces résultats montrent que notre système de virométrie, malgré sa simplicité, est un outil puissant pour la caractérisation des VLPs à l'échelle de la particule unique quant à leur quantification et la détermination de leur taille. Cependant, le NTA présente l'avantage de pouvoir

quantifier aussi les nanoparticules non-fluorescentes en lumière diffusée, dans notre cas les EVs d'origine cellulaire.

Nous avons profité de cette particularité du NTA pour estimer la proportion d'EVs dans nos échantillons viraux. Dans des échantillons viraux produits pendant 5h d'une population polyclonale de HEK 293, le pourcentage d'EVs est de 80% pour 20% de VLPs. Une proportion similaire a été rapportée avec des HEK 293 transfectées transitoirement avec Gag-GFP (Gonzalez-Dominguez et al., 2020b). Ceci précise notre vision de nos échantillons viraux dans lesquels les virus sont en fait très minoritaires. Nous pourrions également mesurer le taux d'EVs avec notre système avec l'utilisation d'un marqueur fluorescent de membrane lipidique tel que le WGA (Wheat Germ Agglutinin) par exemple. Puisque les EVs et les VLPs sont enveloppés par la MP cellulaire, les premiers seront colorés en rouge et les VLPs en rouge et vert. La quantification des deux populations nous permettra, comme dans le cas du NTA, d'établir le rapport VLPs : EVs. En plus, nous pourrions comparer les surnageants de cellules transfectées ou pas et voir l'impact du virus sur la biogenèse des EVs à l'échelle de la cellule unique. Nous entrons là dans un champ d'investigations tout à fait d'actualité où virologie et biologie cellulaire s'entremêlent. En effet, les EVs ressemblent aux virus enveloppés, tant sur le plan structurel que fonctionnel. Par analogie avec la biogenèse virale dépendante de la machinerie cellulaire ESCRT comme VIH, certaines de ces vésicules sont générées à l'intérieur des cellules et, une fois libérées dans le milieu extracellulaire, sont appelées « exosomes ». D'autres bourgeonnent à partir de la MP et sont généralement appelées « microvésicules » (pour revue : (Mulcahy et al., 2014)). De nombreuses études s'intéressent aux rôles des EVs dans les infections virales et montrent que les EVs peuvent servir d'alliées des virus VIH, VHC et du SARS mais aussi d'inhibiteurs dans une certaine mesure (pour revue : (Alqatawni et al., 2020; Ellwanger et al., 2017; Giannessi et al., 2020)). Par ailleurs, les EVs en qualité de communicateurs entre cellules sont aussi largement étudiées pour la vectorisation d'agents thérapeutiques (pour revue : (Silva et al., 2021)).

- Couplage capture + détection de virus

Plusieurs designs ont été nécessaires. Dans un premier temps, une puce couplée à un seul canal a été conçue. Par contre, malgré l'efficacité de la capture de cellules uniques et le respect des lois hydrodynamiques, nous n'avons pas pu étudier le relargage viral de manière plus approfondie à cause du reflux provenant de la sortie et qui s'accroissait avec le temps. Malheureusement, après deux mois d'un travail laborieux, seules deux expériences ont été concluantes. Nous avons alors conçu une deuxième génération de puces, qu'on nomme puce couplée multiplexe. Cette puce est constituée de dix canaux parallèles les uns aux autres et perpendiculaire au canal principal. Cette géométrie permet d'assurer un flux continu vers la sortie qui, dans ce cas, peut rester ouverte empêchant ainsi toute contamination. Simultanément, le flux qui traverse les cellules piégées amène les virions relargués loin (évite le bleaching des cellules) vers la région de détection où s'effectue la vidéomicroscopie en utilisant un objectif 40x à air. Malheureusement celui-ci ne permet le suivi que de deux canaux simultanément. Mais les 10 canaux augmentent la probabilité de piéger côte à côte deux cellules vivantes et productrices. Même si je ne l'ai pas fait, après le suivi de la production de deux cellules adjacentes, il reste possible en décalant l'objectif sur d'autres canaux adjacents d'étudier d'autres cellules piégées (s'il y en a).

La bonne opération de cette puce double fonction consiste en un reflux vers l'entrée des cellules, des contraintes de cisaillement physiologiques sur la cellule piégée, une détection complète des virions au niveau du canal de détection ($v < 300 \mu\text{m/s}$) et une absence de toute contamination croisée entre les cellules piégées. Cette dernière a été confirmée par l'absence de virions dans un canal dépourvu de cellule piégée, adjacent à un canal ayant une cellule piégée. En outre, les simulations COMSOL montrent une régularité dans les lignes du flux sans aucune interférence entre les 10 canaux. Ceci assure une quantification fiable et sensible de la production virale de chacune des cellules piégées.

La puce couplée multiplexe a été utilisée pour l'étude de la cinétique de production virale de deux types cellulaires : HeLa monoclonales et HEK 293 polyclonales. L'établissement de la lignée monoclonale avait comme objectif de tester la reproductibilité de nos mesures. Ensuite, l'utilisation d'une population polyclonale de cellules moins adhérentes que les cellules HeLa nous permet d'évaluer le degré d'hétérogénéité entre les cellules du même type cellulaire mais aussi entre ces deux

types cellulaires. Nous avons étudié la production d'une quinzaine de cellules de chaque type cellulaire. Après la capture des vidéos de 3min sont prises au niveau du canal de détection pour une durée minimale de 1h avec des interruptions durant lesquelles la viabilité des cellules piégées et l'absence de contamination virale sont vérifiées. Les vidéos sont ensuite analysées image par image sur une échelle de 30s. Nous avons mesuré un taux de production des cellules HeLa de 41 ± 4 VLPs / cellule / h. Ce résultat est comparable à celui que nous avons calculé à partir des mesures de surnageants collectés à partir de ces mêmes cellules HeLa cultivées en boîte de 10cm (53 ± 8 VLPs / cellule / h). Ceci confirme que la cellule piégée dans notre système microfluidique présente la même production que lorsqu'elle est en culture parmi des millions de cellules. Ainsi, les conditions de capture en milieu conditionné, malgré les contraintes mécaniques, miment bien l'environnement d'une population de cellules en culture. Ceci montre également que les virions relargués par les cellules piégées n'adhèrent pas aux parois et sont bien tous amenés par le flux jusqu'au canal de détection. La fiabilité et la sensibilité de leur détection dans le canal sont également confirmées. Cette analogie entre cellule unique et population de cellule en culture a été aussi validée pour les cellules HEK 293 polyclonales avec une production moyenne de 56 ± 10 VLPs / cellule / h. Il est difficile de comparer nos résultats avec d'autres travaux car sauf erreur je n'en ai pas trouvé dans la littérature à l'exception d'une étude en 2020 réalisée par NTA avec une population de HEK 293 en culture (transfectées transitoirement par le plasmide VIH Gag-GFP) qui fait une estimation 3 fois inférieure à nos valeurs (Gonzalez-Dominguez et al., 2020b) mais qui reste tout de même dans le même ordre de grandeur. Quant au degré de variation entre cellules de même type, les cellules HeLa et HEK 293 présentent 10% et 18% d'hétérogénéité, respectivement. Les cellules monoclonales sont plus homogènes puisqu'elles proviennent d'une cellule unique et présentent toutes la même quantité et le même site d'insertion du plasmide, ce qui n'est pas le cas pour les cellules polyclonales. Si on compare cette fois les productions de HeLa et HEK 293, il n'y a pas de différence significative, suggérant que l'assemblage et le relargage viral s'effectuent selon le même mécanisme.

Notre étude de la dynamique de production à l'échelle de la cellule unique nous a révélé une caractéristique tout à fait inattendue. La moyenne mobile établie sur 4 pas de temps ($4 \times 30s = 2min$) montre pour la première fois une production des VLPs non régulière et quasi-périodique. Tout d'abord, on observe que la production se

caractérise par des périodes plus courtes avec une plus grande amplitude durant la première heure après la capture. Les cellules en suspension présentent une courbure caractéristique de leur MP qui facilite l'assemblage de Gag et le relargage viral (Inamdar et al., 2021). Ensuite, leur adhérence et le contact avec la surface du piège pourraient être à l'origine des périodes plus grandes, observées après une heure suivant leur capture. De plus, la trypsinisation des cellules induit la polymérisation de l'actine qui favorise le bourgeonnement et le relargage viral (Gladnikoff et al., 2009; Haghparast et al., 2015). Il a été démontré que l'inhibition de ce mécanisme par la Cytochalasin D modifie la distribution intracellulaire de Gag et inhibe la production du virus (Rey et al., 1996; Sasaki et al., 1995). Il serait intéressant d'étudier l'effet du réarrangement du cytosquelette cellulaire sur la production virale qui peut être réalisé en introduisant dans le milieu de perfusion un inhibiteur de polymérisation comme la latrunculine A (Coué et al., 1987), ou bien au contraire une drogue stabilisant l'actine comme la Jasplakinolide (Holzinger, 2009).

La moyenne mobile nous a permis de définir une période moyenne fluctue de 3,8 et 4 min pour les cellules HeLa et HEK 293, respectivement. Un contrôle négatif sans cellule en injectant juste un échantillon des VLP-GFP dans la puce multiplexe, nous permet de confirmer que la périodicité observée avec les cellules productrices est un phénomène biologique et indique la présence d'une ou plusieurs étapes limitantes dans le processus de formation des particules VIH. Bien que non triviales, des investigations supplémentaires devront être menées pour les identifier. Il est troublant de noter que cette périodicité de 4min correspond au temps attribué à une pause transcriptionnelle qui est responsable d'une expression périodique des gènes (Henriques et al., 2018; Tantale et al., 2021) et qui pourrait conduire, dans le cas du VIH-1, à une accumulation périodique des protéines Gag pour l'assemblage et le relargage viral.

Maintenant que la preuve de concept de notre technologie est réalisée, nous allons pouvoir passer à un système biologique plus physiologique. Nous étudierons la production virale de cellules cibles du VIH, comme les cellules Jurkat, lignée immortalisée de lymphocytes T CD4 humain. Elles présentent l'avantage d'être non-adhérentes et donc ne nécessitent pas une trypsinisation avant leur introduction dans la puce. Nous verrons si comme rapporté par Bednarska et al., en 2020 la faible rigidité de leur MP favorise la formation des VLPs. De plus, nous allons passer à des particules virales plus proches du VIH-1 infectieux. Dans l'équipe, il a été construit un

plasmide exprimant un VIH-GFP non infectieux (Env inactivée) qui permettra la biogenèse de virions presque complet à l'exception des protéines Env dont l'expression nécessiterait le travail en L3. L'expression de la protéine virale Tat pourrait augmenter le taux de production virale vu son rôle dans la progression de la transcription. De plus, l'expression des protéines virales régulatrices et accessoires qui régulent la réplication du virus et interagissent avec les protéines cellulaires nous permettra de mieux comprendre l'interaction virus-hôte pour la biogenèse des virions. Par exemple, la protéine Vpu qui favorise le relargage des particules virales par son interaction avec la protéine antivirale tétherine, son expression pourrait modifier la cinétique du relargage. D'autre part, nous étudierons également l'effet du cycle cellulaire sur la cinétique de production. Le fait que le virus utilise la machinerie cellulaire pour sa réplication, l'expression de ses gènes est fortement dépendante du cycle cellulaire. Une cellule en phase quiescente G0 pourrait ralentir la production virale alors qu'une autre cellule active favorise la réplication et le relargage viral. D'où l'intérêt de synchroniser les cellules avant leur introduction dans la puce et d'évaluer la production virale.

Pour conclure, l'approche de la viro-fluidique développée dans notre équipe nous a permis de déterminer pour la première fois le taux de production virale du VIH-1 ainsi qu'une périodicité inattendue du relargage de VLPs au niveau de la cellule unique. Les données présentées dans cette étude tracent le chemin pour des recherches plus avancées afin de mieux comprendre le processus de biogenèse du VIH-1. Cette technique pourrait maintenant être appliquée pour l'étude d'autres pathogènes pandémiques tels que le coronavirus (COVID), ou d'autres pathogènes émergents, qui font d'ailleurs l'objet de recherche de plusieurs équipes de notre institut comme par exemple les virus Zika et Chikungunya. La microfluidique permet non seulement d'isoler une cellule unique mais aussi de mimer l'environnement sanguin par l'intermédiaire du flux. De plus, il est possible d'injecter des molécules dans l'écoulement et de suivre en temps l'évolution structurelle et fonctionnelle de la cellule et d'effectuer un criblage moléculaire systématique.

Bibliographie

- Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clement, J.F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M., Boccaccio, G., Mouland, A.J., 2010. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci* 123, 369-383.
- Abram, M.E., Ferris, A.L., Shao, W., Alvord, W.G., Hughes, S.H., 2010. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol* 84, 9864-9878.
- Affram, Y., Zapata, J.C., Gholizadeh, Z., Tolbert, W.D., Zhou, W., Iglesias-Ussel, M.D., Pazgier, M., Ray, K., Latinovic, O.S., F., R., 2019. The HIV-1 antisens protein ASP is a transmembrane protein of the cell surface and an integral protein of the viral envelope. *virology* 93, 1-16.
- Alfadhli, A., Staubus, A.O., Tedbury, P.R., Novikova, M., Freed, E.O., Barklis, E., 2019. Analysis of HIV-1 Matrix-Envelope Cytoplasmic Tail Interactions. *J Virol* 93.
- Alqatawni, A., Sharma, A.L., Attilus, B., Tyagi, M., Daniel, R., 2020. Shedding Light on the Role of Extracellular Vesicles in HIV Infection and Wound Healing. *Viruses* 12.
- Ambrose, Z., Aiken, C., 2014. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology* 454-455, 371-379.
- Amini, H., Lee, W., Di Carlo, D., 2014. Inertial microfluidic physics. *Lab Chip* 14, 2739-2761.
- Bachrach, E., Dreja, H., Lin, Y.L., Mettling, C., Pinet, V., Corbeau, P., Piechaczyk, M., 2005. Effects of virion surface gp120 density on infection by HIV-1 and viral production by infected cells. *Virology* 332, 418-429.
- Bai, Y., Tambe, A., Zhou, K., Doudna, J.A., 2014. RNA-guided assembly of Rev-RRE nuclear export complexes. *Elife* 3, e03656.
- Balasubramaniam, M., Freed, E.O., 2011. New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)* 26, 236-251.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Barre-Sinoussi, F., Cherman, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 126-129.
- Bednarska, J., Pelchen-Matthews, A., Novak, P., Burden, J.J., Summers, P.A., Kuimova, M.K., Korchev, Y., Marsh, M., Shevchuk, A., 2020. Rapid formation of human immunodeficiency virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 21637-21646.
- Beebe, D.J., Mensing, G.A., Walker, G.M., 2002. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng* 4, 261-286.
- Bell, N.M., Lever, A.M., 2013. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol* 21, 136-144.
- Bernacchi, S., Abd El-Wahab, E.W., Dubois, N., Hijnen, M., Smyth, R.P., Mak, J., Marquet, R., Paillart, J.C., 2017. HIV-1 Pr55(Gag) binds genomic and spliced RNAs with different affinity and stoichiometry. *RNA Biol* 14, 90-103.
- Bet, A., Maze, E.A., Bansal, A., Sterrett, S., Gross, A., Graff-Dubois, S., Samri, A., Guihot, A., Katlama, C., Theodorou, I., Mesnard, J.M., Moris, A., Goepfert, P.A., Cardinaud, S., 2015. The HIV-1 antisense protein (ASP) induces CD8 T cell responses during chronic infection. *Retrovirology* 12, 15.

- Bleck, M., Itano, M.S., Johnson, D.S., Thomas, V.K., North, A.J., Bieniasz, P.D., Simon, S.M., 2014. Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 12211-12216.
- Bolinger, C., Sharma, A., Singh, D., Yu, L., Boris-Lawrie, K., 2010. RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. *Nucleic Acids Res* 38, 1686-1696.
- Bonar, M.M., Tilton, J.C., 2017. High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry. *Virology* 505, 80-90.
- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.M., Hildreth, J.E., Gould, S.J., 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172, 923-935.
- Booth, D.S., Cheng, Y., Frankel, A.D., 2014. The export receptor Crm1 forms a dimer to promote nuclear export of HIV RNA. *Elife* 3, e04121.
- Boutant, E., Bonzi, J., Anton, H., Nasim, M.B., Cathagne, R., Real, E., Dujardin, D., Carl, P., Didier, P., Paillart, J.C., Marquet, R., Mely, Y., de Rocquigny, H., Bernacchi, S., 2020. Zinc Fingers in HIV-1 Gag Precursor Are Not Equivalent for gRNA Recruitment at the Plasma Membrane. *Biophys J* 119, 419-433.
- Brandenberg, O.F., Magnus, C., Rusert, P., Regoes, R.R., Trkola, A., 2015. Different infectivity of HIV-1 strains is linked to number of envelope trimers required for entry. *PLoS Pathog* 11, e1004595.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L., Sonenberg, N., 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77, 3939-3949.
- Briggs, J.A.G., Simon, M.N., Gross, I., Kräusslich, H.-G., Fuller, S.D., Vogt, V.M., Johnson, M.C., 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 672-675.
- Bruus, H., 2007. *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press ed.
- Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.S., Pathak, V.K., 2020. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 5486-5493.
- Burdick, R.C., Pathak, V.K., 2021. Efficient HIV-1 in vitro reverse transcription: optimal capsid stability is required. *Signal Transduct Target Ther* 6, 13.
- Caccuri, F., Marsico, S., Fiorentini, S., Caruso, A., FGiagulli, C., 2016. HIV-1 Matrix p17 and its receptors. *Current Drug Targets* 17, 23-32.
- Chamontin, C., Rassam, P., Ferrer, M., Racine, P.-J., Neyret, A., Lainé, S., Milhiet, P.-E., Mougél, M., 2015. HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Research* 43, 336-347.
- Checkley, M.A., Luttge, B.G., Freed, E.O., 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410, 582-608.
- Chen, B., 2016. HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure. *Biochemistry* 55, 2539-2552.
- Chen, B., 2019. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol* 27, 878-891.
- Chen, J., Powell, D., Hu, W.S., 2006. High frequency of genetic recombination is a common feature of primate lentivirus replication. *J Virol* 80, 9651-9658.

- Chen, J., Rahman, S.A., Nikolaitchik, O.A., Grunwald, D., Sardo, L., Burdick, R.C., Plisov, S., Liang, E., Tai, S., Pathak, V.K., Hu, W.S., 2016. HIV-1 RNA genome dimerizes on the plasma membrane in the presence of Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E201-208.
- Chen, J., Rhodes, T.D., Hu, W.S., 2005. Comparison of the genetic recombination rates of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages and T cells. *J Virol* 79, 9337-9340.
- Chukkapalli, V., Oh, S.J., Ono, A., 2010. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1600-1605.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P., Siliciano, R.F., 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
- Ciuffi, A., Bushman, F.D., 2006. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet* 22, 388-395.
- Clever, J., Sasseti, C., Parslow, T.G., 1995. RNA Secondary Structure and Binding Sites for gag Gene Products in the 59 Packaging Signal of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Virology* 69, 2101-2109.
- Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., Haynes, B.F., 2011. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 364, 1943-1954.
- Colin, L., Verdin, E., Van Lint, C., 2014. HIV-1 chromatin, transcription, and the regulatory protein Tat. *Methods Mol Biol* 1087, 85-101.
- Comas-Garcia, M., Davis, S.R., Rein, A., 2016. On the Selective Packaging of Genomic RNA by HIV-1. *Viruses* 8.
- Convery, N., Gadegaard, N., 2019. 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering* 2, 76-91.
- Coué, M., Brenner, S.L., Spector, I., Korn, E.D., 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS* 213, 316-318.
- Craigie, R., Bushman, F.D., 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006890.
- Cuevas, J.M., Geller, R., Garijo, R., Lopez-Aldeguer, J., Sanjuan, R., 2015. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol* 13, e1002251.
- Cullen, B.R., 2005. Human Immunodeficiency virus: Nuclear RNA export unwound. *Nature* 433, 26-27.
- Dahmane, S., Doucet, C., Le Gall, A., Chamontin, C., Dosset, P., Murcy, F., Fernandez, L., Salas, D., Rubinstein, E., Mougél, M., Nollmann, M., Milhiet, P.E., 2019. Nanoscale organization of tetraspanins during HIV-1 budding by correlative dSTORM/AFM. *Nanoscale* 11, 6036-6044.
- Damgaard, C.K., Andersen, E.S., Knudsen, B., Gorodkin, J., Kjems, J., 2004. RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *J Mol Biol* 336, 369-379.
- Datta, S.A., Clark, P.K., Fan, L., Ma, B., Harvin, D.P., Sowder, R.C., 2nd, Nussinov, R., Wang, Y.X., Rein, A., 2016. Dimerization of the SP1 Region of HIV-1 Gag Induces a Helical Conformation and Association into Helical Bundles: Implications for Particle Assembly. *J Virol* 90, 1773-1787.
- Datta, S.A., Temeselew, L.G., Crist, R.M., Soheilian, F., Kamata, A., Mirro, J., Harvin, D., Nagashima, K., Cachau, R.E., Rein, A., 2011. On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J Virol* 85, 4111-4121.

- De Boer, R.J., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., 2010. Current estimates for HIV-1 production imply rapid viral clearance in lymphoid tissues. *PLoS Comput Biol* 6, e1000906.
- de Breyne, S., Ohlmann, T., 2018. Focus on Translation Initiation of the HIV-1 mRNAs. *Int J Mol Sci* 20.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrick, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., 1990. Isolation and Partial Characterization of an Unusual Human Immunodeficiency Rtrovirus from Two Persons of West-Central African Origin. *Virology* 64, 1207-1216.
- de Marco, A., Heuser, A.M., Glass, B., Krausslich, H.G., Muller, B., Briggs, J.A., 2012. Role of the SP2 domain and its proteolytic cleavage in HIV-1 structural maturation and infectivity. *J Virol* 86, 13708-13716.
- Delelis, O., Carayon, K., Saib, A., Deprez, E., Mouscadet, J.F., 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114.
- Deml, L., Speth, C., Dierich, M.P., Wolf, H., Wagner, R., 2005. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses *Molecular Immunology* 42, 259-277.
- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., Campbell, E.M., 2020. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol* 5, 1088-1095.
- Didierlaurent, L., Racine, P.J., Houzet, L., Chamontin, C., Berkhout, B., Mougél, M., 2011. Role of HIV-1 RNA and protein determinants for the selective packaging of spliced and unspliced viral RNA and host U6 and 7SL RNA in virus particles. *Nucleic Acids Res* 39, 8915-8927.
- Dilley, K.A., Nikolaitchik, O.A., Galli, A., Burdick, R.C., Levine, L., Li, K., Rein, A., Pathak, V.K., Hu, W.S., 2017. Interactions between HIV-1 Gag and Viral RNA Genome Enhance Virion Assembly. *Virology* 91, 1-11.
- Ding, P., Kharytonchyk, S., Waller, A., Mbaekwe, U., Basappa, S., Kuo, N., Frank, H.M., Quasney, C., Kidane, A., Swanson, C., Van, V., Sarkar, M., Cannistraci, E., Chaudhary, R., Flores, H., Telesnitsky, A., Summers, M.F., 2020. Identification of the initial nucleocapsid recognition element in the HIV-1 RNA packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 17737-17746.
- Dubois, N., Khoo, K.K., Ghossein, S., Seissler, T., Wolff, P., McKinsty, W.J., Mak, J., Paillart, J.C., Marquet, R., Bernacchi, S., 2018. The C-terminal p6 domain of the HIV-1 Pr55(Gag) precursor is required for specific binding to the genomic RNA. *RNA Biol* 15, 923-936.
- Dupire, J., Socol, M., Viallat, A., 2012a. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *PNAS* 109, 20808-20813.
- Dupire, J., Socol, M., Viallat, A., 2012b. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 20808-20813.
- Durand, S., Seigneuret, F., Burlaud-Gaillard, J., Lemoine, R., Tassi, M.F., Moreau, A., Mougél, M., Roingeard, P., Tauber, C., de Rocquigny, H., 2022. Quantitative analysis of the formation of nucleoprotein complexes between HIV-1 Gag protein and genomic RNA using transmission electron microscopy. *J Biol Chem* 298, 101500.
- Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoude, G., Jadwin, J.A., de La Cruz, J., Nagashima, K., Bouamr, F., 2009. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog* 5, e1000339.
- Eastep, G.N., Ghanam, R.H., Green, T.J., Saad, J.S., 2021. Structural characterization of HIV-1 matrix mutants implicated in envelope incorporation. *J Biol Chem* 296, 100321.

- Eid, J., Mougél, M., Socol, M., 2020. Advances in Continuous Microfluidics-Based Technologies for the Study of HIV Infection. *Viruses* 12, 982.
- El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mely, Y., de Rocquigny, H., 2015. Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *J Mol Biol* 427, 1480-1494.
- Ellwanger, J.H., Veit, T.D., Chies, J.A.B., 2017. Exosomes in HIV infection: A review and critical look. *Infect Genet Evol* 53, 146-154.
- Emery, A., Swanstrom, R., 2021. HIV-1: To Splice or Not to Splice, That Is the Question. *Viruses* 13.
- Engelman, A.N., 2021. HIV Capsid and Integration Targeting. *Viruses* 13.
- Engelman, A.N., Singh, P.K., 2018. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. *Cell Mol Life Sci* 75, 2491-2507.
- Fassati, A., Goff, S.P., 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75, 3626-3635.
- Fedosov, D.A., Peltomäki, M., Gompper, G., 2014. Deformation and dynamics of red blood cells in flow through cylindrical microchannels. *Soft Matter* 10, 4258-4267.
- Fernandez, J., Arhel, N.J., 2020. [Transportin-1 orchestrates HIV-1 uncoating and nuclear entry]. *Med Sci (Paris)* 36, 203-206.
- Fernandez, J., Machado, A.K., Lonnais, S., Chamontin, C., Gartner, K., Leger, T., Henriquet, C., Garcia, C., Portilho, D.M., Pugniere, M., Chaloin, L., Muriaux, D., Yamauchi, Y., Blaise, M., Nisole, S., Arhel, N.J., 2019. Transportin-1 binds to the HIV-1 capsid via a nuclear localization signal and triggers uncoating. *Nat Microbiol* 4, 1840-1850.
- Ferrer, M., Clerté, C., Chamontin, C., Basyuk, E., Lainé, S., Hottin, J., Bertrand, E., Margeat, E., Mougél, M., 2016. Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. *Nucleic Acids Research* 44, 7922-7934.
- Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W., 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res* 27, 796-810.
- Fontana, J., Keller, P.W., Urano, E., Ablan, S.D., Steven, A.C., Freed, E.O., 2016. Identification of an HIV-1 Mutation in Spacer Peptide 1 That Stabilizes the Immature CA-SP1 Lattice. *J Virol* 90, 972-978.
- Foster, J.L., Garcia, J.V., 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5, 84.
- Francis, A.C., Marin, M., Prellberg, M.J., Palermينو-Rowland, K., Melikyan, G.B., 2020. HIV-1 Uncoating and Nuclear Import Precede the Completion of Reverse Transcription in Cell Lines and in Primary Macrophages. *Viruses* 12.
- Frankel, A.D., Young, J.A.T., 1998. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu.Rev.Biochem* 67, 1-25.
- Freed, E.O., 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 13, 484-496.
- Friedrich, M., Setz, C., Hahn, F., Matthaëi, A., Fraedrich, K., Rauch, P., Henklein, P., Traxdorf, M., Fossen, T., Schubert, U., 2016. Glutamic Acid Residues in HIV-1 p6 Regulate Virus Budding and Membrane Association of Gag. *Viruses* 8, 117.
- Gholizadeh, Z., Iqbal, M.S., Li, R., Romerio, F., 2021. The HIV-1 Antisense Gene ASP: The New Kid on the Block. *Vaccines (Basel)* 9.

- Giannessi, F., Aiello, A., Franchi, F., Percario, Z.A., Affabris, E., 2020. The Role of Extracellular Vesicles as Allies of HIV, HCV and SARS Viruses. *Viruses* 12.
- Gilchrist, M.A., Coombs, D., Perelson, A.S., 2004. Optimizing within-host viral fitness: infected cell lifespan and virion production rate. *J Theor Biol* 229, 281-288.
- Gladnikoff, M., Shimoni, E., Gov, N.S., Rousso, I., 2009. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys J* 97, 2419-2428.
- Goila-Gaur, R., Strebel, K., 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 51.
- Gonzalez-Dominguez, I., Puente-Massaguer, E., Cervera, L., Godia, F., 2020a. Quality Assessment of Virus-Like Particles at Single Particle Level: A Comparative Study. *Viruses* 12.
- Gonzalez-Dominguez, I., Puente-Massaguer, E., Cervera, L., Godia, F., 2020b. Quantification of the HIV-1 virus-like particle production process by super-resolution imaging: From VLP budding to nanoparticle analysis. *Biotechnol Bioeng* 117, 1929-1945.
- Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3195-3199.
- Grandgenett, D.P., Pandey, K.K., Bera, S., Aihara, H., 2015. Multifunctional facets of retrovirus integrase. *World J Biol Chem* 6, 83-94.
- Grigorov, B., Decimo, D., Smagulova, F., Pechoux, C., Mougél, M., Muriaux, D., Darlix, J.L., 2007. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* 4, 54.
- Grohmann, D., Godet, J., Mély, Y., Darlix, J.L., Restle, T., 2008. HIV-1 Nucleocapsid Traps Reverse Transcriptase on Nucleic Acid Substrates. *Biochemistry* 47, 12230-12240.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., Picker, L.J., 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12, 289-295.
- Gulnik, S., Erickson, J.W., Xie, D., 2000. HIV Protease: Enzyme Function and Drug Resistance. *Vitamins and Hormones* 58, 213-256.
- Guo, F., Liang, C., 2012. Transmembrane Interactions of HIV-1 Vpu and Tetherin. *Current HIV Research* 10, 292-297.
- Gutierrez-Granados, S., Cervera, L., Godia, F., Carrillo, J., Segura, M.M., 2013. Development and validation of a quantitation assay for fluorescently tagged HIV-1 virus-like particles. *J Virol Methods* 193, 85-95.
- Haase, A.T., Henry, K., Zupancic, M., Sedgewick, G., Faust, R.A., Melroe, H., Cavert, W., Gebhard, K., Staskus, K., Zhang, Z., Dailey, P.J., Balfour, H.H., Erice, A., Perelson, A.S., 1996. Quantitative Image Analysis of HIV-1 Infection in Lymphoid Tissue. *Science* 274.
- Haghparast, S.M., Kihara, T., Miyake, J., 2015. Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states. *PeerJ* 3, e1131.
- Heigle, A., Sauter, D., Munch, J., Kirchhoff, F., 2014. HIV-1 accessory proteins: Nef. *Methods Mol Biol* 1087, 115-123.
- Hemelaar, J., 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18, 182-192.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., Isolation, W.-U.N.f.H., Characterisation, 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 25, 679-689.

- Hendrix, J., Baumgartel, V., Schrimpf, W., Ivanchenko, S., Digman, M.A., Gratton, E., Krausslich, H.G., Muller, B., Lamb, D.C., 2015. Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J Cell Biol* 210, 629-646.
- Henriques, T., Scruggs, B.S., Inouye, M.O., Muse, G.W., Williams, L.H., Burkholder, A.B., Lavender, C.A., Fargo, D.C., Adelman, K., 2018. Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes & Development* 32, 26-41.
- Hill, M.K., Bellamy-McIntyre, A., Vella, L.J., Campbell, S.M., Marshall, J.A., Tachedjian, G., Mak, J., 2007. Alteration of the Proline at Position 7 of the HIV-1 Spacer Peptide p1 Suppresses Viral Infectivity in a Strain Dependent Manner. *Current HIV Research* 5, 69-78.
- Hockett, R.D., Kilby, J.M., Derdeyn, C.A., Saag, M.S., Sillers, M., Squires, K., Chiz, S., Nowak, M.A., Shaw, G.M., Bucy, R.P., 1999. Constant Mean Viral Copy Number per Infected Cell in Tissues Regardless of High, Low, or Undetectable Plasma HIV RNA. *J. Exp. Med.* 189, 1545-1554.
- Hogue, I.B., Grover, J.R., Soheilian, F., Nagashima, K., Ono, A., 2011. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol* 85, 9749-9766.
- Holmes, M., Zhang, F., Bieniasz, P.D., 2015. Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication. *PLoS Pathog* 11, e1004961.
- Holzinger, A., 2009. Jasplakinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization. *Methods Mol Biol* 586, 71-87.
- Hou, X., Zhang, Y.S., Santiago, G.T.-d., Alvarez, M.M., Ribas, J., Jonas, S.J., Weiss, P.S., Andrews, A.M., Aizenberg, J., Khademhosseini, A., 2017. Interplay between materials and microfluidics. *Nature Reviews Materials* 2.
- Houzet, L., Morichaud, Z., Didierlaurent, L., Muriaux, D., Darlix, J.L., Mougél, M., 2008. Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Res* 36, 2311-2319.
- Houzet, L., Morichaud, Z., Mougél, M., 2007a. Fully-spliced HIV-1 RNAs are reverse transcribed with similar efficiencies as the genomic RNA in virions and cells, but more efficiently in AZT-treated cells. *Retrovirology* 4, 30.
- Houzet, L., Paillart, J.C., Smagulova, F., Maurel, S., Morichaud, Z., Marquet, R., Mougél, M., 2007b. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 35, 2695-2704.
- Hu, W.S., Hughes, S.H., 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A., Rozycki, B., 2010. Membrane budding. *Cell* 143, 875-887.
- Hurley, J.H., Cada, A.K., 2018. Inside job: how the ESCRTs release HIV-1 from infected cells. *Biochem Soc Trans* 46, 1029-1036.
- Hurt, C.B., Nelson, J.A.E., Hightow-Weidman, L.B., Miller, W.C., 2017. Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers. *Sex Transm Dis* 44, 739-746.
- Inamdar, K., Tsai, F.C., Dibsby, R., de Poret, A., Manzi, J., Merida, P., Muller, R., Lappalainen, P., Roingeard, P., Mak, J., Bassereau, P., Favard, C., Muriaux, D., 2021. Full assembly of HIV-1 particles requires assistance of the membrane curvature factor IRSp53. *Elife* 10.
- Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Kräusslich, H.-G., Eils, R., Rohr, K., Bräuchle, C., Müller, B., Lamb, D.C., 2009. Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLoS Pathogens* 5, e1000652.

- Jetzt, A.E., Yu, H., Klarmann, G.J., Ron, Y., Preston, B.D., Dougherty, J.P., 2000. High Rate of Recombination throughout the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. *Virology* 74, 1234-1240.
- Joseph, P., Cottin-Bizonne, C., Benoit, J.-M., Ybert, C., Journet, C., Tabeling, P., Bocquet, L., 2006. Slippage of water past superhydrophobic carbon nanotube forests in microchannels. *Physical Review Letters* 97.
- Jouvenet, N., 2012. Dynamics of ESCRT proteins. *Cell Mol Life Sci* 69, 4121-4133.
- Jouvenet, N., Bieniasz, P.D., Simon, S.M., 2008. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454, 236-240.
- Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., 2006. Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly. *PLoS Biol* 4, 2296-2310.
- Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., 2009. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *PNAS* 106, 19114-19119.
- Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., 2011. Visualizing HIV-1 assembly. *J Mol Biol* 410, 501-511.
- Kandathil, A.J., Ramalingam, S., Kannangai, R., David, S., Sridharan, G., 2005. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res* 121, 333-344.
- Karageorgos, L., Burrell, C., 1993. Characterization of HIV Replication Complexes Early After Cell-to-Cell Infection. *Aids Research and Human Retroviruses* 9, 817-823.
- Karn, J., Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006916.
- Kim, B.C., Ju, M.K., Dan-Chin-Yu, A., Sommer, P., 2009. Quantitative Detection of HIV-1 Particles Using HIV-1 Neutralizing Antibody-Conjugated Beads. *Analytical Chemistry* 81, 2388-2393.
- Klingler, J., Anton, H., Real, E., Zeiger, M., Moog, C., Mely, Y., Boutant, E., 2020. How HIV-1 Gag Manipulates Its Host Cell Proteins: A Focus on Interactors of the Nucleocapsid Domain. *Viruses* 12.
- Kremer, M., Schnierle, B.S., 2005. HIV-1 Vif: HIV's Weapon Against the Cellular Defense Factor APOBEC3G. *Current HIV Research* 3, 339-344.
- Kroupa, T., Datta, S.A.K., Rein, A., 2020. Distinct Contributions of Different Domains within the HIV-1 Gag Polyprotein to Specific and Nonspecific Interactions with RNA. *Viruses* 12.
- Krupkin, M., Jackson, L.N., Ha, B., Puglisi, E.V., 2020. Advances in understanding the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Curr Opin Struct Biol* 65, 175-183.
- Ku, P.I., Bendjennat, M., Ballew, J., Landesman, M.B., Saffarian, S., 2014. ALIX is recruited temporarily into HIV-1 budding sites at the end of gag assembly. *PLoS One* 9, e96950.
- Ku, P.I., Miller, A.K., Ballew, J., Sandrin, V., Adler, F.R., Saffarian, S., 2013. Identification of pauses during formation of HIV-1 virus like particles. *Biophys J* 105, 2262-2272.
- Kutluay, S.B., Bieniasz, P.D., 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* 6, e1001200.
- Kutluay, S.B., Zang, T., Blanco-Melo, D., Powell, C., Jannain, D., Errando, M., Bieniasz, P.D., 2014. Global changes in the RNA binding specificity of HIV-1 gag regulate virion genesis. *Cell* 159, 1096-1109.

- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.F., 2005. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1-Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication, *HIV/AIDS*, pp. 1053-1056.
- Lanchy, J.-M., Keith, G., Le Grice, S.F.J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Marquet, R., 1998. Contacts between Reverse Transcriptase and the Primer Strand Govern the Transition from Initiation to Elongation of HIV-1 Reverse Transcription. *Biological Chemistry* 273, 24425-24432.
- Landry, S., Halin, M., Lefort, S., Audet, B., Vaquero, C., Mesnard, J.M., Barbeau, B., 2007. Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology* 4, 71.
- Lauga, E., Brenner, M., Stone, H., 2007. Microfluidics: The No-Slip Boundary Condition. *Experimental Fluid Dynamics*, 1219-1240.
- Lavado-Garcia, J., Gonzalez-Dominguez, I., Cervera, L., Jorge, I., Vazquez, J., Godia, F., 2020. Molecular Characterization of the Coproduced Extracellular Vesicles in HEK293 during Virus-Like Particle Production. *J Proteome Res* 19, 4516-4532.
- Lavado-Garcia, J., Jorge, I., Boix-Besora, A., Vazquez, J., Godia, F., Cervera, L., 2021. Characterization of HIV-1 virus-like particles and determination of Gag stoichiometry for different production platforms. *Biotechnol Bioeng* 118, 2660-2675.
- Le Saux, S., Aarrass, H., Lai-Kee-Him, J., Bron, P., Armengaud, J., Miotello, G., Bertrand-Michel, J., Dubois, E., George, S., Faklaris, O., Devoisselle, J.M., Legrand, P., Chopineau, J., Morille, M., 2020. Post-production modifications of murine mesenchymal stem cell (mMSC) derived extracellular vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction. *Biomaterials* 231, 119675.
- Lehmann, M., Milev, M.P., Abrahamyan, L., Yao, X.J., Pante, N., Mouland, A.J., 2009. 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* 284, 14572-14585.
- Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., Haase, A.T., 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 434, 1148-1152.
- Li, R., Sklutuis, R., Groebner, J.L., Romerio, F., 2021. HIV-1 Natural Antisense Transcription and Its Role in Viral Persistence. *Viruses* 13.
- Lindemann, D., Steffen, I., Pohlmann, S., 2013. Cellular Entry of Retroviruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 128-149.
- Lindwasser, O.W., Resh, M.D., 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* 75, 7913-7924.
- Liu, W., He, H., Zheng, S.Y., 2020. Microfluidics in Single-Cell Virology: Technologies and Applications. *Trends Biotechnol* 38, 1360-1372.
- Lu, M., Russell, R.W., Bryer, A.J., Quinn, C.M., Hou, G., Zhang, H., Schwieters, C.D., Perilla, J.R., Gronenborn, A.M., Polenova, T., 2020. Atomic-resolution structure of HIV-1 capsid tubes by magic-angle spinning NMR. *Nat Struct Mol Biol* 27, 863-869.
- Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., Campbell, E.M., 2014. HIV-1 Uncoating is Facilitated by Dynein and Kinesin 1. *Virology* 88, 13613-13625.
- Maillot, B., Levy, N., Eiler, S., Crucifix, C., Granger, F., Richert, L., Didier, P., Godet, J., Pradeau-Aubret, K., Emiliani, S., Nazabal, A., Lesbats, P., Parissi, V., Mely, Y., Moras, D., Schultz, P., Ruff, M., 2013. Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PLoS One* 8, e60734.

- Malikov, V., Naghavi, M.H., 2017. Localized Phosphorylation of a Kinesin-1 Adaptor by a Capsid-Associated Kinase Regulates HIV-1 Motility and Uncoating. *Cell Rep* 20, 2792-2799.
- Martin N, Sattentau Q. Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009, 4(2), 143-9.
- Martinez, N.W., Xue, X., Berro, R.G., Kreitzer, G., Resh, M.D., 2008. Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* 82, 9937-9950.
- Mattei, S., Anders, M., Konvalinka, J., Krausslich, H.G., Briggs, J.A., Muller, B., 2014. Induced maturation of human immunodeficiency virus. *J Virol* 88, 13722-13731.
- Mattei, S., Glass, B., Hagen, W.J.H., Krausslich, H.G., Briggs, J.A.G., 2016. The Structure and flexibility of conical HIV-1 capsids determined with intact virions. *Structural Biology* 354, 1434-1437.
- Mély, Y., Rocquigny, H.D., Morellet, N., B.P., R., Gérard, D., 1996. Zinc Binding to the HIV-1 Nucleocapsid Protein: A Thermodynamic Investigation by fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* 35, 5175-5182.
- Miller, R.H., 1988. Human Immunodeficiency Virus May Encode a Novel Protein on the Genomic DNA Plus Strand, *Science*, pp. 1420-1421.
- Moir, S., Chun, T.W., Fauci, A.S., 2011. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 6, 223-248.
- Monette, A., Valiente-Echeverria, F., Rivero, M., Cohen, E.A., Lopez-Lastra, M., Mouland, A.J., 2013. Dual mechanisms of translation initiation of the full-length HIV-1 mRNA contribute to gag synthesis. *PLoS One* 8, e68108.
- Monje-Galvan, V., Voth, G.A., 2020. Binding mechanism of the matrix domain of HIV-1 gag on lipid membranes. *Elife* 9.
- Moore, M.D., Hu, W.S., 2009. HIV-1 RNA Dimerization: It takes Two to Tango. *AIDS* 11, 91-102.
- Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P., Robbiani, M., 2007. Current Concepts of HIV transmission. *The Science of HIV Medicine* 4, 29-35.
- Mougel, M., Houzet, L., Darlix, J.L., 2009. When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology* 6, 24.
- Mouhand, A., Belfetmi, A., Catala, M., Larue, V., Zargarian, L., Brachet, F., Gorelick, R.J., Van Heijenoort, C., Mirambeau, G., Barraud, P., Mauffret, O., Tisne, C., 2018. Modulation of the HIV nucleocapsid dynamics finely tunes its RNA-binding properties during virion genesis. *Nucleic Acids Res* 46, 9699-9710.
- Mouhand, A., Pasi, M., Catala, M., Zargarian, L., Belfetmi, A., Barraud, P., Mauffret, O., Tisne, C., 2020. Overview of the Nucleic-Acid Binding Properties of the HIV-1 Nucleocapsid Protein in Its Different Maturation States. *Viruses* 12.
- Mueller, N., Berkhout, B., Das, A.T., 2015. HIV-1 splicing is controlled by local RNA structure and binding of splicing regulatory proteins at the major 5' splice site. *J Gen Virol* 96, 1906-1917.
- Mueller, N., Pasternak, A.O., Klaver, B., Cornelissen, M., Berkhout, B., Das, A.T., 2018. The HIV-1 Tat Protein Enhances Splicing at the Major Splice Donor Site. *J Virol* 92.
- Mueller, N., van Bel, N., Berkhout, B., Das, A.T., 2014. HIV-1 splicing at the major splice donor site is restricted by RNA structure. *Virology* 468-470, 609-620.

- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter, D.R., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3.
- Murphy, R.E., Saad, J.S., 2020. The Interplay between HIV-1 Gag Binding to the Plasma Membrane and Env Incorporation. *Viruses* 12.
- Musah, R., A., 2004. The HIV-1 Nucleocapsid Zinc Finger Protein as a Target of Antiretroviral Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4, 1605-1622.
- Naillon, A., Joseph, P., Prat, M., 2017. Sodium chloride precipitation reaction coefficient from crystallization experiment in a microfluidic device. *Journal of Crystal Growth* 463, 201-210.
- Ne, E., Palstra, R.J., Mahmoudi, T., 2018. Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter. *Int Rev Cell Mol Biol* 335, 191-243.
- Neil, S.J., Eastman, S.W., Jouvenet, N., Bieniasz, P.D., 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2, e39.
- Nelson, P.W., Gilchrist, M.A., 2004. AN AGE-STRUCTURED MODEL OF HIV INFECTION THAT ALLOWS FOR VARIATIONS IN THE PRODUCTION RATE OF VIRAL PARTICLES AND THE DEATH RATE OF PRODUCTIVELY INFECTED CELLS. *Mathematical Biosciences* 1, 267-288.
- Nomaguchi, M., Fujita, M., Adachi, A., 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect* 10, 960-967.
- Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P., Thali, M., 2003. HIV-1 Egress is Gated Through Late Endosomal Membranes: HIV-1 Egress. *Traffic* 4, 902-910.
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremmentsov, D.N., Foti, M., Thali, M., 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* 173, 795-807.
- Ohno, K.i., Tachikawa, K., Manz, A., 2008. Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis* 29, 4443-4453.
- Ono, A., Freed, E.O., 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *PNAS* 98, 13925-13930.
- Ono, A., Freed, E.O., 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 78, 1552-1563.
- Ooms, M., Abbink, T.E., Pham, C., Berkhout, B., 2007. Circularization of the HIV-1 RNA genome. *Nucleic Acids Res* 35, 5253-5261.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., Marsh, M., 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162, 443-455.
- Pereira, E.A., daSilva, L.L., 2016. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic* 17, 976-996.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D., 1996. HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science* 271, 1582-1586.
- Piekna-Przybylska, D., Sharma, G., Bambara, R.A., 2013. Mechanism of HIV-1 RNA dimerization in the central region of the genome and significance for viral evolution. *J Biol Chem* 288, 24140-24150.
- Pisano, A., 2017. From Tubes and Catheters to the Basis of Hemodynamics: The Hagen–Poiseuille Equation. 55-61.

- Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15, 871-872.
- Poole, E., Strappe, P., Mok, H.P., Hicks, R., Lever, A.M., 2005. HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* 6, 741-755.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., 2011. Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 469, 424-427.
- Post, K., Olson, E.D., Naufer, M.N., Gorelick, R.J., Rouzina, I., Williams, M.C., Musier-Forsyth, K., Levin, J.G., 2016. Mechanistic differences between HIV-1 and SIV nucleocapsid proteins and cross-species HIV-1 genomic RNA recognition. *Retrovirology* 13, 89.
- Prévost, J., Edgar, C.R., Richard, J., Trothen, S.M., Jacob, R.A., Mumby, M.J., S., P., Dubé, M., Kaufmann, D.E., Kirchhoff, F., Neil, S.J.D., Finzi, A., Dikeakos, J.D., 2020. HIV-1 Vpu Downregulates Tim-3 from the Surface of Infected CD4+ T cells. *Virology* 94, 1-18.
- Qu, K., Ke, Z., Zila, V., Anders-Össwein, M., Glass, B., Müller, B., Kräusslich, H.-G., Briggs, J.A.G., 2021. Maturation of the matrix and viral membrane of HIV-1. *Science* 373, 700-704.
- Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., Viora, M., 2009. Immunoregulatory effects of HIV-1 Nef protein. *Biofactors* 35, 169-174.
- Rahman, S.A., Koch, P., Weichsel, J., Godinez, W.J., Schwarz, U., Rohr, K., Lamb, D.C., Krausslich, H.G., Muller, B., 2014. Investigating the Role of F-Actin in Human Immunodeficiency Virus Assembly by Live-Cell Microscopy. *Journal of virology* 88, 7904-7914.
- Raposo, G., Moorem, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., Gueze, H., 2002. Human Macrophages Accumulate HIV-1 Particles in MHC II Compartments. *Traffic* 3, 718-729.
- Reddy, E.P., Dasgupta, P., 1992. Regulation of HIV-1 Gene Expression by Cellular Transcription Factors. *Pathobiology* 60, 219-224.
- Ren, K., Chen, Y., Wu, H., 2014. New materials for microfluidics in biology. *Curr Opin Biotechnol* 25, 78-85.
- Ren, X.X., Wang, H.B., Li, C., Jiang, J.F., Xiong, S.D., Jin, X., Wu, L., Wang, J.H., 2016. HIV-1 Nef-associated Factor 1 Enhances Viral Production by Interacting with CRM1 to Promote Nuclear Export of Unspliced HIV-1 gag mRNA. *J Biol Chem* 291, 4580-4588.
- Renner, T.M., Tang, V.A., Burger, D., Langlois, M.A., 2020. Intact Viral Particle Counts Measured by Flow Virometry Provide Insight into the Infectivity and Genome Packaging Efficiency of Moloney Murine Leukemia Virus. *Journal of virology* 94.
- Retureau, R., Oguey, C., Mauffret, O., Hartmann, B., 2019. Structural Explorations of NCp7-Nucleic Acid Complexes Give Keys to Decipher the Binding Process. *J Mol Biol* 431, 1966-1980.
- Rey, O., Canon, J., Krogstad, P., 1996. HIV-1 Gag Protein Associates with F-actin Present in Microfilaments. *Virology* 220, 530-534.
- Reynolds, O., 1883. An Experimental Investigation of the Circumstances which determine whether the Motion of Water shall be Direct or Sinuous, and of the Law of Resistance in Parallel Channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, pp. 935-982.
- Roy, B.B., Russell, R.S., Turner, D., Liang, C., 2006. The T12I mutation within the SP1 region of Gag restricts packaging of spliced viral RNA into human immunodeficiency virus type 1 with mutated RNA packaging signals and mutated nucleocapsid sequence. *Virology* 344, 304-314.

- Rulli, S.J., Jr., Hibbert, C.S., Mirro, J., Pederson, T., Biswal, S., Rein, A., 2007. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol* 81, 6623-6631.
- Russell, R.S., Liang, C., Wainberg, M.A., 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* 1, 23.
- Saad, J.S., Loeliger, E., Luncsford, P., M., L., Tai, J., Kim, A., Miller, J., Joshi, A., Freed, E.O., Summers, M.F., 2007. Point Mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. *J Mol Biol* 366, 574-585.
- Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., Summers, M.F., 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *PNAS* 103, 11364-11369.
- Sackmann, E.K., Fulton, A.L., Beebe, D.J., 2014. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 507, 181-189.
- Salamango, D.J., Harris, R.S., 2021. Demystifying Cell Cycle Arrest by HIV-1 Vif. *Trends Microbiol* 29, 381-384.
- Sasaki, H., Nakamura, M., Ohno, T., Matsuda, Y., Yuda, Y., Nonomura, Y., 1995. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2026-2030.
- Sasaki, H., Ozaki, H., Karaki, H., Nonomura, Y., 2004. Actin filaments play an essential role for transport of nascent HIV-1 proteins in host cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 588-593.
- Selyutina, A., Persaud, M., Lee, K., KewalRamani, V., Diaz-Griffero, F., 2020. Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating. *Cell Rep* 32, 108201.
- Shaw, G.M., Hunter, E., 2012. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Shukla, A., Ramirez, N.P., D'Orso, I., 2020. HIV-1 Proviral Transcription and Latency in the New Era. *Viruses* 12.
- Silva, A.K.A., Morille, M., Piffoux, M., Arumugam, S., Mauduit, P., Larghero, J., Bianchi, A., Aubertin, K., Blanc-Brude, O., Noel, D., Velot, E., Ravel, C., Elie-Caille, C., Sebbagh, A., Boulanger, C., Wilhelm, C., Rahmi, G., Raymond-Letron, I., Cherukula, K., Montier, T., Martinaud, C., Bach, J.M., Favre-Bulle, O., Spadavecchia, J., Jorgensen, C., Menasche, P., Aussel, C., Chopineau, J., Mosser, M., Ullah, M., Sailliet, N., Luciani, N., Mathieu, N., Rautou, P.E., Brouard, S., Boireau, W., Jauliac, S., Dedier, M., Trouvin, J.H., Gazeau, F., Trouillas, M., Peltzer, J., Monsel, A., Banzet, S., 2021. Development of extracellular vesicle-based medicinal products: A position paper of the group "Extracellular Vesicle translation to clinical perspectives - EVOLVE France". *Adv Drug Deliv Rev* 179, 114001.
- Simon, F., Mauciere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F., Brun-Vezinet, F., 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4, 1032-1037.
- Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4945-4949.
- Sokolskaja, E., Sayah, D.M., Luban, J., 2004. Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 78, 12800-12808.
- Squires, T.M., Quake, S.R., 2005. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics* 77, 977-1026.
- Steffens, C.M., Hope, T.J., 2003. Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J Virol* 77, 4985-4991.

- Steppert, P., Burgstaller, D., Klausberger, M., Tover, A., Berger, E., Jungbauer, A., 2017. Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis. *Journal of Chromatography A* 1487, 89-99.
- Su, F., Chakrabarty, K., Fair, R.B., 2006. Microfluidics-Based Biochips: Technology Issues, Implementation Platforms, and Design-Automation Challenges. *IEEE Transactions on Computer-Aided Design of Integrated Circuits and Systems* 25, 211-223.
- Sukosd, Z., Andersen, E.S., Seemann, S.E., Jensen, M.K., Hansen, M., Gorodkin, J., Kjems, J., 2015. Full-length RNA structure prediction of the HIV-1 genome reveals a conserved core domain. *Nucleic Acids Res* 43, 10168-10179.
- Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., JR., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Al Varado, G., Sowder, R.C., 2nd, Hare, D.R., Arthur, L.O., 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* 1, 563-574.
- Sun, W., Reyes-Serratos, E., Barilla, D., Santos, J.R.L., Bujold, M., Graves, S., Marcet-Palacios, M., 2019. Mathematical determination of the HIV-1 matrix shell structure and its impact on the biology of HIV-1. *PLoS One* 14, e0224965.
- Sundquist, W.I., Krausslich, H.G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006924.
- Suzuki, Y., Craigie, R., 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5, 187-196.
- Tang, V.A., Renner, T.M., Fritzsche, A.K., Burger, D., Langlois, M.A., 2017. Single-Particle Discrimination of Retroviruses from Extracellular Vesicles by Nanoscale Flow Cytometry. *Sci Rep* 7, 17769.
- Taniguchi, I., Mabuchi, N., Ohno, M., 2014. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acids Res* 42, 6645-6658.
- Tantale, K., Garcia-Oliver, E., Robert, M.C., L'Hostis, A., Yang, Y., Tsanov, N., Topno, R., Gostan, T., Kozulic-Pirher, A., Basu-Shrivastava, M., Mukherjee, K., Slaninova, V., Andrau, J.C., Mueller, F., Basyuk, E., Radulescu, O., Bertrand, E., 2021. Stochastic pausing at latent HIV-1 promoters generates transcriptional bursting. *Nat Commun* 12, 4503.
- Tekeste, S.S., Wilkinson, T.A., Weiner, E.M., Xu, X., Miller, J.T., Le Grice, S.F., Clubb, R.T., Chow, S.A., 2015. Interaction between Reverse Transcriptase and Integrase Is Required for Reverse Transcription during HIV-1 Replication. *J Virol* 89, 12058-12069.
- Turner, B.G., Summers, M.F., 1999. Structural Biology of HIV. *J.Mol.Biol* 285, 1-32.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., H, G.G., 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem Soc Trans* 37, 181-184.
- VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., Carter, C.A., 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55Gag. *pnas* 98, 7724-7729.
- Volmink, J., Marais, B., 2007. HIV:mother-to-child transmission, *ClinicalEvidence*, pp. 1-21.
- Wanaguru, M., Bishop, K.N., 2021. HIV-1 Gag Recruits Oligomeric Vpr via Two Binding Sites in p6, but Both Mature p6 and Vpr Are Rapidly Lost upon Target Cell Entry. *Virology* 95, 1-15.
- Wang, X., Milner, T.E., Chen, Z., Nelson, J.S., 1997. Measurement of fluid-flow-velocity profile in turbid media by the use of optical Doppler tomography. *Applied Optics* 36, 144-149.
- Wang, X., Xuan, Y., Han, Y., Ding, X., Ye, K., Yang, F., Gao, P., Goff, S.P., Gao, G., 2019. Regulation of HIV-1 Gag-Pol Expression by Shiftless, an Inhibitor of Programmed -1 Ribosomal Frameshifting. *Cell* 176, 625-635 e614.

- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368-373.
- Whitesides, G.M., Stroock, A.D., 2001. Flexible Methods for Microfluidics. *Physics Today*.
- Wilén, C.B., Tilton, J.C., Doms, R.W., 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2.
- Wright, E.R., Schooler, J.B., GJane Ding, H., Kieffer, C., Fillmore, C., Sundquist, W.I., Jensen, G.J., 2007. Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and Sp1 Gag shells. *EMBO Journal* 26, 2218-2226.
- Wrobel, M., 2020. An efficient algorithm of solution for the flow of generalized Newtonian fluid in channels of simple geometries. *Rheologica Acta* 59, 651-663.
- Zamora, J.L.R., Aguilar, H.C., 2018. Flow virometry as a tool to study viruses. *Methods* 134-135, 87-97.
- Zhang, F., Bieniasz, P.D., 2020. HIV-1 Vpr induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137. *Elife* 9.
- Zhang, J., Yan, S., Yuan, D., Alici, G., Nguyen, N.T., Ebrahimi Warkiani, M., Li, W., 2016. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. *Lab Chip* 16, 10-34.
- Zhang, X., Aida, Y., 2009. HIV-1 Vpr: A Novel Role in Regulating RNA Splicing. *Current HIV Research* 7, 163-168.
- Zhao, R.Y., Bukrinsky, M.I., 2014. HIV-1 accessory proteins: VpR. *Methods Mol Biol* 1087, 125-134.
- Zhao, R.Y., Li, G., Bukrinsky, M.I., 2011. Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol* 6, 216-229.
- Zhu, P., Chertova, E., Jr, J.B., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A., Roux, K.H., 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *PNAS* 100, 15812-15817.
- Zila, V., Margiotta, E., Turonova, B., Muller, T.G., Zimmerli, C.E., Mattei, S., Allegretti, M., Borner, K., Rada, J., Muller, B., Lusic, M., Krausslich, H.G., Beck, M., 2021. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell* 184, 1032-1046 e1018.

Annexe

Les connaissances et les compétences techniques que j'ai développées durant ma thèse m'ont permis de contribuer à la rédaction d'un article (soumis à Nano Letters) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Fabien Montel à Lyon.

L'équipe développe une technique de détection et de quantification des nanoparticules qui consiste à utiliser des membranes de polycarbonate avec des nanopores de diamètre 400 nm et une densité de 10^8 nanopores /cm². Ces membranes sont recouvertes d'une couche d'or qui évite la propagation de la lumière à travers la membrane et permet l'amplification du signal de fluorescence de nanoparticules lors de leur passage le long des nanopores (par un effet Zero-Mode Waveguide - ZMW). Leur système fluidique contient deux chambres (*cis* / *trans*) situées de part et d'autre de la membrane poreuse et entre lesquelles une différence de pression est appliquée. Celle-ci permet le transport des nanoparticules fluorescentes qui seront visualisées quand elles passent du côté du film en or illuminé par un faisceau laser. Au niveau de la chambre *trans*, la fluorescence sera perdue due au photobleaching des particules ou bien à la défocalisation suite à leur éloignement de la membrane (**Figure 46**).

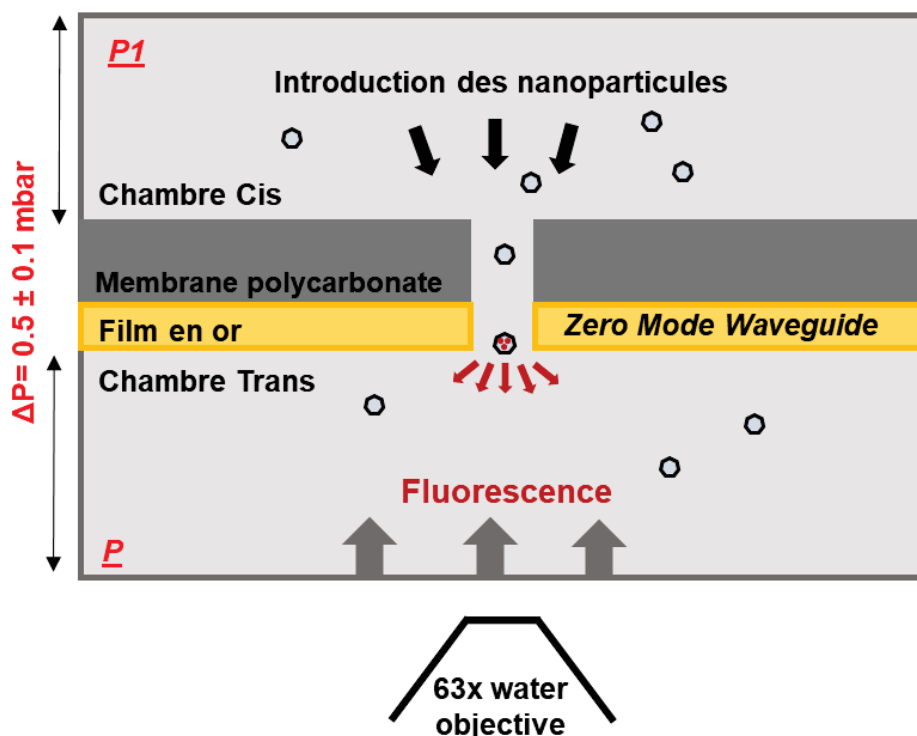


Figure 46: Illustration du système Zero-Mode Waveguide (ZMW)

L'introduction de la solution des nanoparticules s'effectue dans la chambre cis où il n'y a pas d'illumination. La différence de pression ΔP (0.5 ± 0.1 mbar) exercée entre les deux chambres cis et trans permet le transport des particules qui seront illuminées et détectées lors de leur passage le long du nanopore. Au niveau du film en or, leur signal fluorescent sera amplifié par l'effet ZMW ce qui permet une détection des particules faiblement fluorescentes. Une fois qu'elles atteignent la chambre *trans* elles ne seront pas visualisées à cause du photobleaching ou bien de la défocalisation.

Dans le cadre de cette collaboration, j'ai participé à la préparation du stock des nanoparticules obtenu après 5, 24, 48 et 72h de production: les VLPs du VIH-1 sont collectés à partir d'une population de cellules HeLa monoclonales productrices et les EVs à partir des cellules parentales HeLa non productrices. Après leur filtration (à 0.45 μm), quelques échantillons sont analysés directement alors que d'autres sont concentrés par ultracentrifugation sur un coussin de sucrose 20% à 30 000 rpm et 4°C pour 1h30min. La fiabilité de la technique des nanopores est testée par l'analyse parallèle que j'ai effectuée avec la technique du NTA. La quantification est faite pour les échantillons VIH-1, EV et des stocks de virions et de virus infectieux du MLV (Murine Leukemia Virus). Ceux-ci ont été préparés par la transfection de cellules NIH3T3 (mouse embryonic fibroblast cells) par Gag-GFP et MLV-GFP réalisée par Dr. Marylène Mougel. La corrélation des résultats obtenus par les deux méthodes de

quantification a confirmé la fiabilité de la technique des nanopores à l'échelle de la particule unique. D'autre part, sa polyvalence a été révélée par la possibilité de quantifier non seulement les virus marqués par GFP mais aussi les EVs qui ont été rendues fluorescentes par le DiO (marqueur de la membrane lipidique), et les virus HBV (Hepatitis B Virus) et AAV (Adeno Associated Virus) marqués au YOYO-1 (marqueur des acides nucléiques). Enfin, la LOD inférieure est déterminée par l'analyse d'un échantillon dilué en série dont la concentration initiale est connue. Elle est de l'ordre de 10^5 particules / ml analysées en 1min. A noter qu'il est possible d'améliorer 100x la sensibilité pour atteindre 10^3 particules / ml pour un temps d'acquisition de 1h. Ces différents aspects sont comparés à ceux de notre système de détection dans le **Tableau 6** ci-dessous.

Critère	Technique	Virométrie en puce de détection	Nanopores
Dimensions		$h = 3,7 / 6,7 \mu\text{m}$, $w = 130 \mu\text{m}$	$D = 400 \text{ nm}$, 10^8 pores / cm^2 de membrane
Champ de détection		Toute la hauteur	10^5 pores en parallèle
Type de détection		Fluorescence	Fluorescence + Effet ZMW
LOD inférieure (particules/ml) (même temps d'analyse)		10^4	10^3

Tableau 6: Comparaison entre notre virométrie avec la puce de détection et la technique des nanopores.

Pour conclure, le système nanopores avec son effet ZMW est prometteur et nous réfléchissons à une technique pour combiner notre technique de viro-fluidique avec celle des nanopores dans le but de détecter des nanoparticules faiblement fluorescentes. Ceci pourrait être réalisable en remplaçant le canal de détection par une membrane nanoporeuse. L'intégration de la membrane polycarbonate dans le PDMS nécessite de mettre en place une méthodologie particulière pour éviter toute fuite de fluide qui pourrait provoquer la perte des virions relargués par la cellule piégée.

Optical Quantification by Nanopores of Viruses, Extracellular Vesicles and Nanoparticles

Léa Chazot-Franguiadakis¹, Joelle Eid², Marius Socol², Bastien Molcrette¹, Philippe Guégan³, Marylène Mougél², Anna Salvetti⁴, and Fabien Montel^{1*}

¹ *Laboratoire de Physique, UMR CNRS 5672, ENS de Lyon, Université de Lyon, Lyon, France*

² *Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, UMR CNRS 9004, Université de Montpellier, Montpellier, France*

³ *Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 8232, Sorbonne Université, Paris, France*

⁴ *Centre de Recherche International en Infectiologie, UMR CNRS 5308, Université de Lyon, INSERM, Lyon, France*

E-mail: fabien.montel@ens-lyon.fr

Abstract

Nanopores combined with optical approaches can be used to detect viral particles. In this work, we demonstrate the ability of hydrodynamical driving and optical sensing to identify and quantify viral particles in a biological sample. We have developed a simple and rapid method which requires only fluorescent labelling of the particles and can therefore be applied to a wide range of virus type. The system operates in real time and at the single particle level while providing a low error on concentration (4%)

and a low limit of detection of 10^5 particles/mL for an acquisition time of 60 seconds, with the ability to increase the acquisition time to achieve a lower limit.

Keywords: Nanopore, Virus, Extracellular Vesicles, Nanoparticles, Zero Mode Waveguide, Concentration measurement.

Introduction

The rapid and accurate quantification of viruses is crucial to gain information on viral infection processes and is still a goal to achieve in clinical and basic research. Currently commercially available assays offer noteworthy detection limits, for example 200 DNA copies/mL for quantitative commercial real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)-based assays^[1,2], or $6 - 10 \times 10^5$ particles/mL for Western Blot/ ELISA assays^[3]. In any case, these methods are time-consuming (about 24 hours for ELISA or Western Blot), too specific (ELISA and Western Blot assays can be carried out only if a primary antibody against the protein of interest is available), and sometimes inaccurate (due to off-target effects and saturation of the signal)^[4,5]. Therefore, they do not fully respond to the requested specifications in several fields of application such as clinical diagnosis (live monitoring of virus levels in patient samples) and basic research which may focus on different stages of the virus cycle (entry into the cell, reverse transcription, release of new virions,...). To meet demand several microfluidic and single molecule based quantification techniques are now under development^[6-7]. For instance, commercial Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) can be used to determine concentration and size distribution of fluorescent viral particles. NTA offers a limit of detection (LOD) of 10^6 particles/mL and a manipulation time of a few hours^[8-10]. Interferometric light microscopy can also be used to quantify viruses while measuring scattered signal and Brownian motion but the LOD is elevated ($10^8 - 10^{10}$ particles/mL)^[11].

An interesting compromise between a low LOD and real-time acquisition can be found in nanopore devices that have been developed in recent years and have tended to become a

new standard for DNA/RNA sequencing^{[12][13]}. Nanopore devices with single-molecule and real-time detection capabilities are of great interest to detect and quantify viruses as they open new avenues for the development of simpler, faster and more compact quantification alternatives. Most methods based on nanopore rely on genome detection and quantification with electrical sensing^{[14][17]}, but optical detection is a possible alternative. In that sense, Zero-Mode Waveguide (ZMW) methods combined with nanopore have been showed to be powerful tools, as they allow enhanced DNA sequencing^{[18][20]}.

Some other techniques using electrical detection, are probing the virus as a whole. These techniques, referred as Resistive Pulse Sensing techniques, are based on quantifying changes in resistance using a nanoscale constriction. In practice, a voltage is applied between the two sides of the pore and when an object enters the pore the variations of the ionic current are measured^{[21][23]}. It is thus possible to detect and quantify viruses with an interesting lower practical count limit of $5 \cdot 10^7$ particles/mL as reported by De Blois and Wesley team^[24]. Interestingly, these methods can be used to obtain information on the size of the objects, and even establish size distribution profile^[25], since the variation in resistance of the pore is directly related to the sizes of the pore and of the object crossing it. Nevertheless, to date they mainly focus on the determination of particle size and not on a quantitative measurement of concentration^[26]. This can be explained by some limitations of these systems, notably the fact that they remain too unspecific since any object passing through the pore will be detected, as well as objects that do not cross the pore but only come close to the surface and diffuse back. This represents a major bottleneck in order to quantify viral concentration. Moreover, it can be added that electrical detection can only detect particle transport in pores that are of the same diameter than particle which increases plugging risk. This is not the case, in optical detection, where the pore can be much larger than the virus size.

Ultimately, despite these advances, a technological gap remains as there is no nanopore-optical technique to quantify virus concentration. It should be remembered that viruses are particular biological objects and whether for techniques using electrical or optical detection,

the solid state nanopores are often made of SiN or SiC which makes the virus stick to the pore.

In this work, we proposed to use hydrodynamical driving of viral particles through artificial low cost nanopores and optical detection. We developed a simple and sensitive method which required only fluorescent labelling of particles and an initial calibration of our experimental setup. It allowed us to be more specific but also versatile. Moreover, the track-etched membranes that we used were particularly relevant for this type of application since they were optimized to reduce biofouling. We showed that our setup can be used to detect biological particles and accurately determine their concentration in a small volume of biological sample with a low LOD of about 10^5 particles/mL for an acquisition time of 60 seconds (possibility to increase the acquisition time over 60 seconds to reach a lower LOD, for example about 1 hour to reach a LOD of 10^3 particles/mL). Moreover, we detected different types of viral particles and also discriminated viruses from extracellular vesicles to finally shed light on the versatility of the method.

Results and discussion

The viral particles used in this study are representative of the large range of virus population often encountered either for biotechnology application, or as pathology generator: enveloped/non-enveloped, DNA, viruses, retroviruses as detailed in Fig. 1A. As enveloped viruses, Human Immunodeficiency Virus (HIV) was used as non-infectious Virus-Like Particle (VLP) form. VLP structurally mimics the native virus but is devoid of the viral genome. It is a promising candidate for vaccination²⁷. VLP HIV were obtained from monoclonal human HeLa cells stably expressing Gag-GFP. Murine Leukemia Virus (MLV) was used in the form of both VLP and complete enveloped virus cultivated from NIH3T3 mouse embryonic fibroblast cells. For these two retroviruses, fluorescent labelling relied on Green Fluorescent

Protein (GFP, $\lambda_{exc} = 488nm / \lambda_{em} = 507nm$) insertion into viral genome and expressed as Gag-GFP fusion²⁸, which did not alter the properties of the virus^{29,30}.

As non-enveloped viruses we relied on Adeno-Associated Virus (AAV, serotypes 8/9) which have gained interest for genetic therapies and vaccination processes over past years. Stocks of AAV-8 and AAV-9 recombinant particles were generated by calcium phosphate transfection of HEK-293 cells and analysed by AFM as described previously in literature³¹. Hepatite B Virus (HBV) was also used in a non-enveloped form (ie non-infectious form), that was purified from a viral stock of infectious HBV particles (genotype D) concentrated on a 20% sucrose cushion. AAV and HBV were fluorescently labelled using intercalating fluorophore YOYO-1 (*Molecular Probes*, 1mM in DMSO, $\lambda_{exc} = 491nm / \lambda_{em} = 509nm$) which targets viral DNA.

Besides, we handled Extracellular Vesicles (EVs) which are constituted of lipids and proteins and sometimes contain cellular genetic material. Such composition often lead them to be mistaken for viruses. EVs have been shown to play key roles in various cellular processes as regulation, intercellular signalling, but also in infectious diseases where they facilitate spreading, and escape from immune surveillance³²⁻³⁴. So far, few methods are able to distinguish viruses from EVs³⁵. EVs used in this study were obtained from HIV or MLV producing cells and from uninfected cells. By using lipid bilayer markers DiO or DiL (*Molecular Probes*) we were able to fluorescently label EVs and to distinguish them from non enveloped viruses. All particles were depicted in Fig. 1A, and more precision can be found in Supporting Information.

Both particles, with existing fluorescent label and without initial fluorescent label, can be used. As for particles without initial fluorescent label, we used a one-step labelling procedure, which simply involved incubating the sample with a small volume of fluorophores ($< 1\mu L$) for a few minutes (10 to 15 min of incubation). By using several types of fluorophores, we were able to label a wide range of viruses as well as extracellular vesicles. Those fluorophores were passive markers, without interaction with the nanopores and therefore they did not

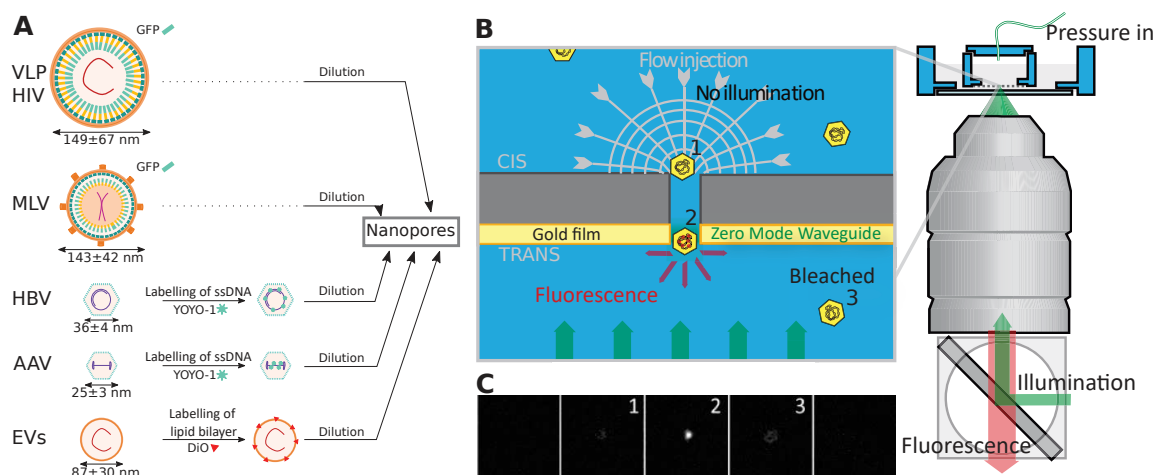


Figure 1: A. Characteristics of particles and experimental protocol used in this study. From top to bottom: VLP HIV, Virus Like Particle of Human Immunodeficiency Virus; MLV, Murine Leukemia Virus; HBV, Hepatite B Virus; AAV, Adeno Associated Virus (serotype 8 and 9); EVs, Extracellular Vesicles. Fluorescent labelling of particles was required: it can be achieved by genome modification (GFP labelling for HIV and MLV) or directly by adding fluorophores in the sample (YOYO-1 for AAV and HBV, DiO for EVs). Potential cellular DNA is represented in red in VLP HIV and EVs, viral RNA in pink in MLV, and viral DNA in purple in HBV and AAV. Samples were then diluted. Sizes were determined by NTA for HIV, MLV and EVs and by Cryo-EM reconstruction for AAV^[36] and HBV^[37]. B. Zero Mode Waveguide setup for particles translocation through nanopores. The cis chamber contained the fluorescently labelled particles. Upon pressure application, the particles were pushed through the pore in the trans chamber and illuminated as soon as they cross the evanescent field region at the end of the pore. Once they have left the pore, they were unfocused and bleached. C. Snapshots of a single particle exit. Frame rate: 100 fps. Image size: 10 μm .

alter the translocation of the viral particles (more information can be found in Supporting Information, S2). As mentioned, the particles were fluorescently labelled and then injected in the cis chamber of our setup. As shown in Fig. 1B, hydrodynamical driving induced by a pressure difference imposed by a microcontroller (MFCS, Fluigent) between the two sides of a nanoporous membrane (coated with a 50 nm thick gold layer on the trans side) was used to force translocation of particles from cis to trans side. The membranes used were track-etched membranes (Whatman, GE Polycarbonate) produced through heavy ion irradiation and they are commercially available dense arrays of cylindrical nanopores of controlled diameter and high density (1×10^8 pores/cm²). After crossing the membrane, successful translocation events were detected by a Zero-Mode Waveguide (ZMW) setup. Briefly, the nanoporous array was illuminated by a laser beam ($\lambda_{exc} = 473nm$) on the trans side and the gold layer inhibited the propagation of light through the membrane. It also induced an enhancement of the electromagnetic field in the nanopore on a depth equivalent to the radius of the pore whereas the electrical field was null at the surface of the membrane^{38,39}. This effect enabled to optically separate the fluorescence signal of translocating particles from particles in the bulk (see Supporting Information and Ref⁴⁰). The main advantage of this method is its ability to detect events with a large parallelization (in our case 10^5 pores in parallel). All types of particles used in this study were successfully detected at the exit of nanopores with a signal to noise ratio superior to 2, and an example of particle exit can be found in Fig. 1C. Complementary experiences highlighting the benefits and relevance of the ZMW, as well as the evolution of the intensity fluorescence of an event with time, are available in Supporting Information (S2).

Thereafter, in order to be able to determine virus concentration with our ZMW setup, we first made a calibration of nanoporous membranes using fluorescent carboxyl polystyrene nanobeads (NPs, *Spherotech Inc*) from two batches (with sizes determined by DLS measurement) and of known concentrations. Nanobeads were smaller than pore size and acted as flow markers. Indeed, we assumed that the system was dominated by advection (Peclet

number, $P_e > 1$, see Supporting Information) and that the flow in our system verified the Hagen-Poiseuille law⁴¹. This was supported by the fact that we observed a linear increase of translocation frequency of nanobeads with pressure (see Supporting Information).

To perform calibration, we analysed the variation of nanobeads translocation frequency per pore, f , as a function of the concentration, C . The data for both types of nanobeads through pores of 400 nm and at applied pressure of 0.5 mbar were plotted on Fig. 2. The mean of the experimental slope for both types of NPs, α_{NP} ($9.7 \times 10^{-12} \pm 0.7 \times 10^{-12} \text{ mL} \cdot \text{particles}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) was calculated and gave a direct relation between translocation frequency and concentration. We then compared α_{NP} with a coefficient obtained theoretically to validate our calibration (see Supporting Information, S4).

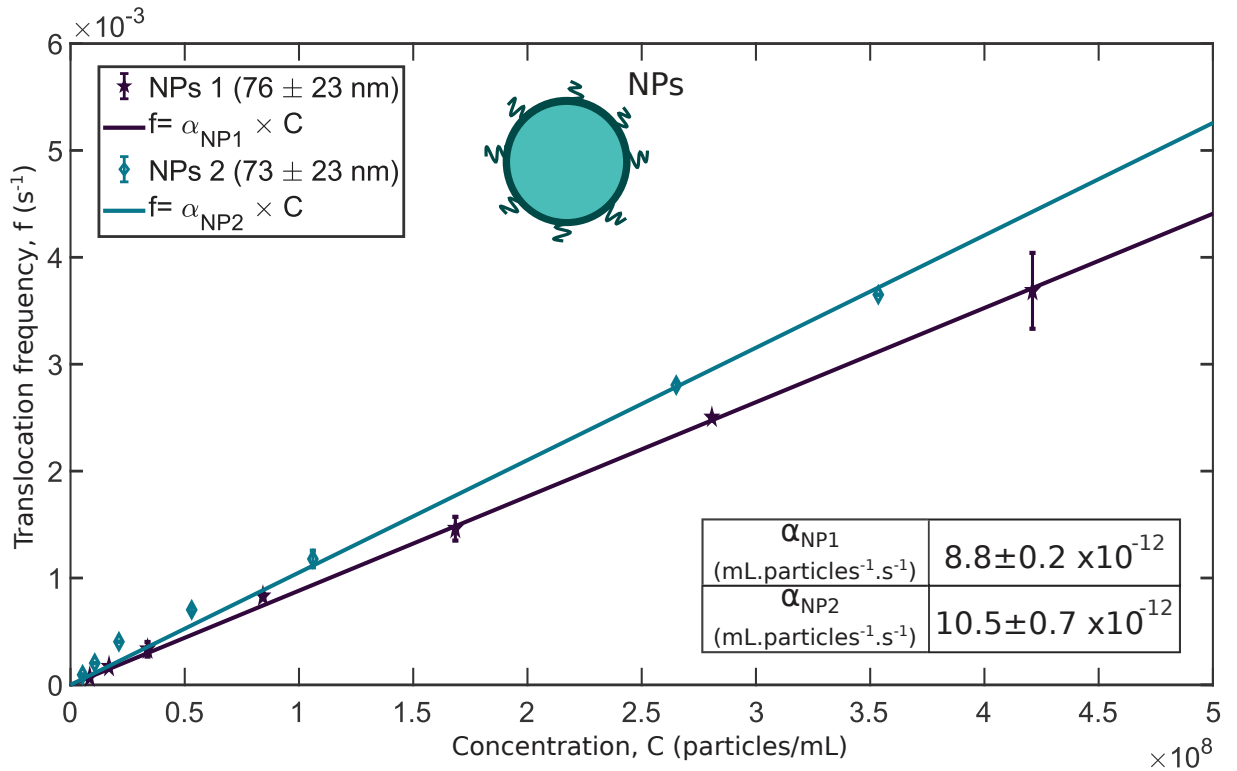


Figure 2: Calibration of the experimental setup using fluorescent polystyrene nanobeads (NPs). Translocation frequency (f), as a function of NPs concentration (C), for two batches of NPs. Continuous blue and violet curves corresponded to linear fit. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0.5. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{\text{replica}} > 36$ for each experimental series.

Based on this calibration, we were then able to determine the viral particles concentration

in biological samples. To do so, we measured the translocation frequency for series of dilutions originating from the same sample. The particle translocation frequency (f) normalized by the particle translocation frequency for the initial sample (f_0) was represented as a function of the dilution ratio (r) on Fig. 3. f_0 was obtained by linear extrapolation from particle translocation frequency (f) when $r = 1$. Each point corresponded to an experiment carried out with a single diluted sample and for each viral type. For each particle type, there were at least four different initial samples of unknown concentration. The linearity of the curve threw light on the fact that each particle going through a nanopore was effectively detected and no jamming effect occurred in the pore.

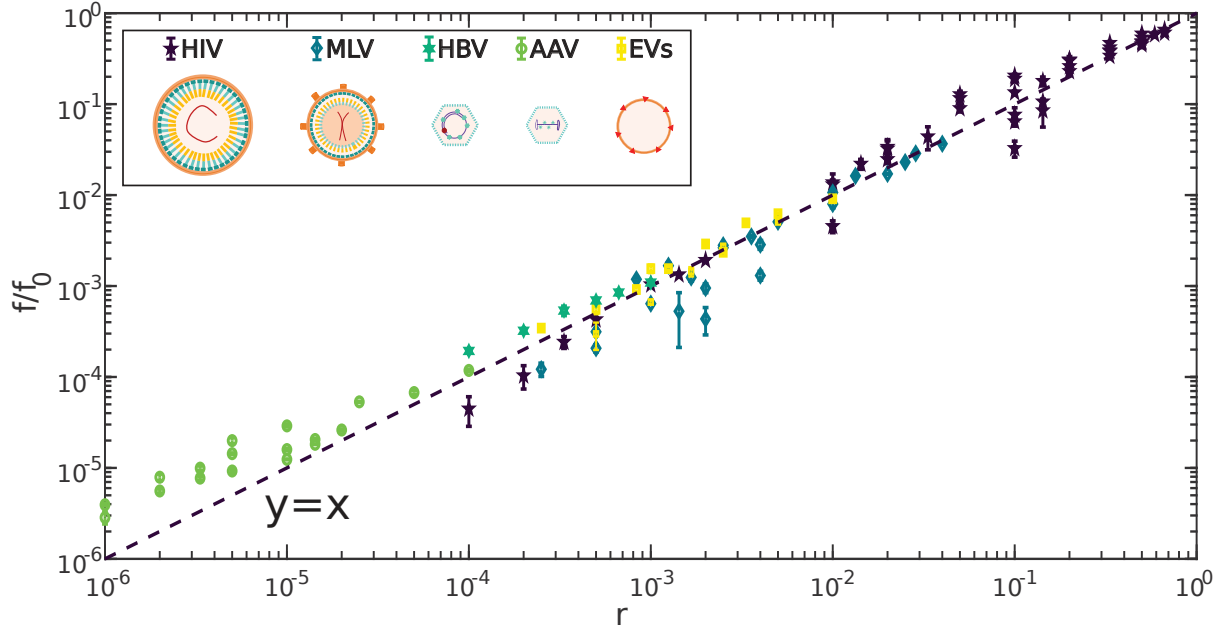


Figure 3: Effect of dilution factor on frequencies of translocation for all biological samples used in this study. Translocation frequency (f) normalized by initial translocation frequency (f_0) as a function of dilution factor (r). For each particle type, different diluted solutions were made from the same initial sample. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{replica} > 24$ for each experimental series.

Initial concentration can then be obtained using calibration coefficient α_{NP} and the

translocation frequency for the initial sample (f_0) relying on the following formula:

$$C_{ZMW} = \frac{f_0}{\alpha_{NP}}, \quad (1)$$

We compared initial concentrations obtained for each biological sample to expected concentrations, that had been obtained by qPCR (for AAV and HBV samples) and NTA (for HIV, MLV and EVs samples). Results were presented in Fig. 4. We observed a good agreement between measured values using ZMW setup and expected values over six decades of concentrations. The slope of linear fit was equal to 0.96, which stood for 4% of error on our measurement. These results threw light on the versatility of our system, since we obtained a good precision for the concentration of all types of particles that were tested. It has to be recalled that each analysis was performed for 60 seconds, providing a total analysis duration of less than 15 minutes. Indeed, the total experimental duration included the incubation time required for the fluorescent labelling of the particles. However, incubation time can be performed at the beginning of an experiment set (for several samples) which allowed to save time.

Finally, given the large range of examined concentrations, we were then interested in determining the limit of detection of our system. To do so, we first determined the LOD theoretically by suggesting that it was reached when a single event was detected in our system, at given experimental conditions. As mentioned earlier, we assumed that the Hagen-Poiseuille law was valid. In this case, the flow through a single pore J , at applied pressure ΔP , can be expressed as follows: $J = \frac{\Delta P}{R_h}$ with $R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4}$, R and L , respectively the radius and the length of the pore, η , the water viscosity.

Therefore, the total number of particles, N_{tot} , at a given concentration C , going through the area of the observed surface S , during an acquisition time t , came as: $N_{tot} = \frac{\Delta P \cdot N_A \cdot t \cdot \sigma \cdot S}{R_h} \cdot C$, with σ the pore density and N_A the Avogadro number.

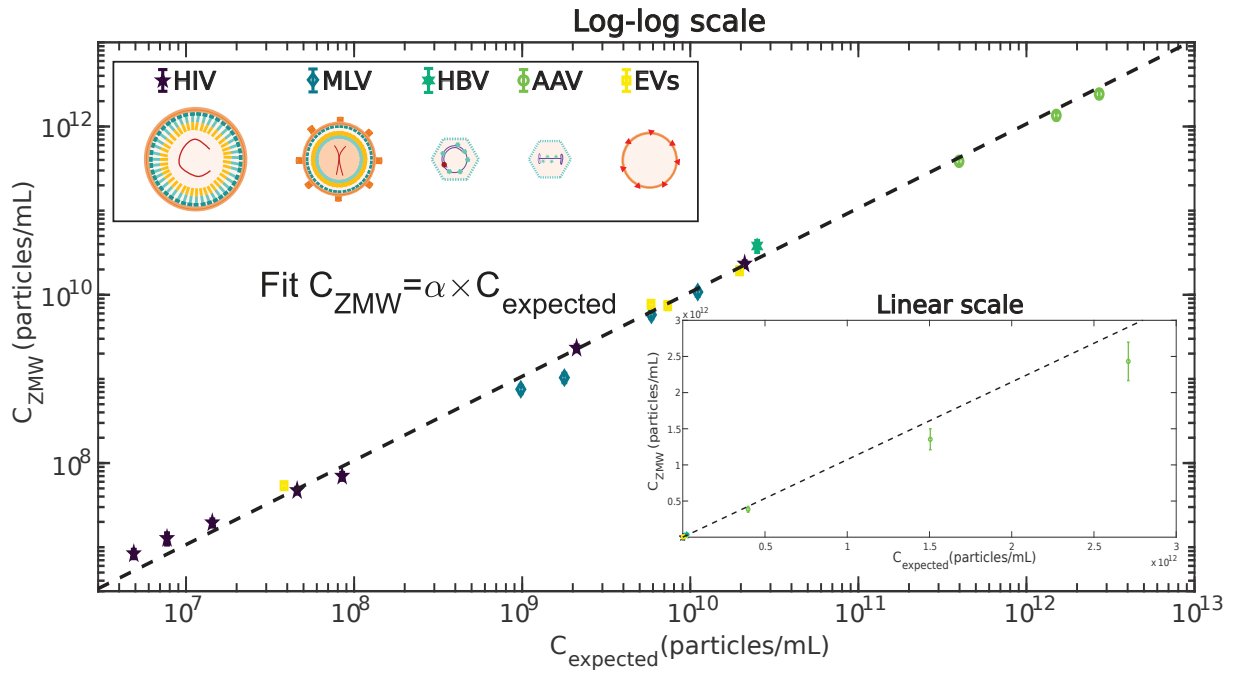


Figure 4: Comparison between concentrations obtained with our experimental setup (C_{ZMW}) and expected concentrations ($C_{expected}$) obtained with other methods (qPCR and NTA). Each point corresponded to a different sample. Results were depicted in log-log scale and also linear scale in the inset. Errorbars took into account standard error for f_0 and the error on the calibration coefficient α_{NP} .

This led to the following formula for the limit of detection (LOD), which was defined as the concentration when the number of observed particles was equal to 1:

$$LOD = \frac{R_h}{\Delta P . N_A . t . \sigma . S} \quad (2)$$

The LOD was then tested experimentally as shown on Fig. 5 on low concentration samples. We plotted the expected concentrations of different viral samples (HIV and AAV), C , as a function of the acquisition time, t . In order to prepare virus solutions at a given low concentration, a range of dilution was performed on a previously measured sample. The black dashed line corresponded to the theoretical LOD. Above this value, the violet circles represented the concentrations that could have been determined using our setup while the blue diamonds were the concentrations that couldn't be measured (no event detected). Almost all of the determined concentrations were above the theoretical LOD. Therefore, it represented a good estimation of the limit of our system. We concluded that the LOD of our system was about 10^5 particles/mL for an acquisition time of 60 seconds. Nevertheless, it was also possible to increase the acquisition time over 60 seconds to reach a lower LOD (for example about 1 hour to reach a LOD of 10^3 particles/mL).

Last but not least, we performed experiments on water coming from a river, since there is an ongoing need for direct counting of biotic nanoparticles such as viruses to probe the state of the river water. Water was collected in the Rhône at Lyon (France, 45°43'34.497" North, 4°49'14.402" East) on September 1st, 2021. To analyze the river water, we first filtered the sample through 0.45 μm pores. We then divided our sample into two parts and fluorescently labeled one of them with YOYO-1 and the other one with DiO. The concentrations obtained using the ZMW setup, were respectively 2.10^7 particles/mL for the YOYO-1 labelled sample and 4.10^7 particles/mL for the DiO labelled sample (more

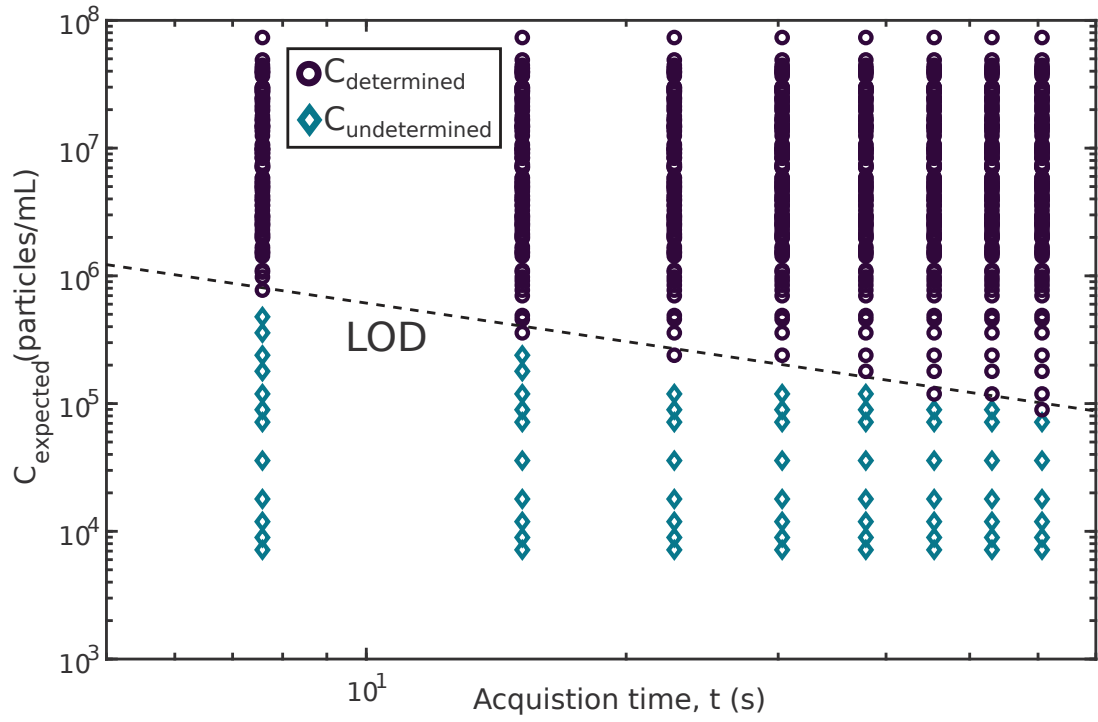


Figure 5: Expected concentrations (C) as a function of acquisition time (t). The black dashed line corresponded to the theoretical LOD. The violet circle represented the concentrations that could have been determined using our setup while the blue diamonds showed the concentrations that couldn't have been measured (no event of translocation detected). Each point corresponded to a diluted sample originating from a viral particle sample whose concentration was determined previously.

information can be found in Supporting Information, S3). Labelling with YOYO-1 allowed us to detect and quantify viruses without envelope such as phytoplankton double-stranded DNA viruses (Myovirus, Podovirus, Siphovirus)^[11] or even Adenovirus and Norovirus that can be found in river water^[42]. Whereas, labelling with DiO allowed us to detect and quantify both viruses with envelope (such as Herpesvirus, HIV, and Coronavirus including SARS-Cov2)^[43-45] and extracellular vesicles^[11]. The orders of magnitude of the concentrations that was found with our method agreed with the values given in literature for other rivers such as the Marne (in Paris France)^[11].

Conclusion

All together these results showed that a combination of nearfield optics technique and fluorescence provided a powerful tool to detect the translocation of individual virus through solid-state nanopores and to quantify their concentration.

Compared to other available methods, the main advantages of our strategy are that we achieved a low LOD and required a small volume of sample while keeping a short experimental duration and a specificity level that can be tuned by the final user. A comparison of the specifications and limits for different quantification methods can be found in the Supporting Information (S4).

More precisely, our technique allowed to work in real time, at the scale of the single particle and to consider the virus as a whole compared to other methods which quantify DNA or specific proteins. The system offered a good precision (4% of error on the concentration) and a low LOD which was adjustable according to the experimental parameters. Moreover, it was possible to quantify the viral particles directly from a complex biological samples (cell medium) comparable to clinical samples but also from real world samples (for example river water), while requiring small volumes. For viral samples whose concentrations were closed to the LOD (10^5 particles/mL), the required volume drop down to 20 μ L. It must be added

that for highly concentrated samples, a dilution step was required to ensure that the linear regime is observed. This can be easily achieved by making a range of dilutions from the same initial sample and by checking that the translocation frequency evolved linearly with the concentration. Working in a diluted regime was valuable to avoid interactions of viruses with the pore. We have added a complementary experiment in Supporting Information (S3), to provide additional information about the necessity of working in diluted mode.

Besides, a major benefit of our system was its versatility since the fluorescent labelling can be adapted to a large range of virus type. By choosing specific fluorophores of different emission lengths it was also possible to detect a mixture of viruses in the same sample by matching the fluorescent tags to the sought viruses. Therefore, two viruses labeled with a different fluorophore could be distinguished. Besides, the use of specific fluorescent labels, prevented us to have signals coming from non-target particles.

This system also had the advantage of using low cost solid-state nanopores, since the nanoporous membranes used were track-etched polycarbonate membranes used for water filtration that allowed to detect events with a large parallelization (10^5 pores in parallel).

Last but not least, a miniaturization of our system can definitely be considered in the near future. The scope of applications of such a system could be numerous in basic research but also in clinic, for titration purposes.

Supporting Information

Supporting Information contains : **S1. Material and Methods** (Viral particles production, Quantification methods, Calibration of experimental setup, Zero Mode Waveguide setup, Image Analysis), **S2. Fluorescence labelling** (Fluorescence tests on YOYO-1, Fluorescence enhancement and ZMW), **S3. Comparison of calibration with theory**, **S4. Comparison with other existing techniques.**

Acknowledgement

The authors thank Cendrine Moskalenko and Martin Castelnovo for their fruitful comments and discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique under the 80 Prime project "NanoViro".

References

- (1) De Pagter, P. J.; Schuurman, R.; De Vos, N. M.; Mackay, W.; Van Loon, A. M. Multicenter external quality assessment of molecular methods for detection of human herpesvirus 6. *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 2536–2540.
- (2) Ruiz-Villalba, A.; Ruijter, J. M.; van den Hoff, M. J. Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting. *Life* **2021**, *11*, 1–22.
- (3) Coorssen, J. R.; Blank, P. S.; Albertorio, F.; Bezrukov, L.; Kolosova, I.; Backlund, P. S.; Zimmerberg, J. Quantitative femto- to attomole immunodetection of regulated secretory vesicle proteins critical to exocytosis. *Analytical Biochemistry* **2002**, *307*, 54–62.
- (4) Ghosh, R.; Gilda, J. E.; Gomes, A. V. Accuracy of Western Blots. *Expert Review of Proteomics* **2014**, *11*, 549–560.
- (5) Eid, J.; Mougél, M.; Socol, M. Advances in Continuous Microfluidics-Based Technologies for the Study of HIV Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 1–16.
- (6) Renner, T. M.; Tang, V. A.; Burger, D.; Langlois, M.-A. Intact Viral Particle Counts Measured by Flow Virometry Provide Insight into the Infectivity and Genome Packaging Efficiency of Moloney Murine Leukemia Virus. *Journal of Virology* **2020**, *94*.
- (7) Welsh, J. A.; van der Pol, E.; Bettin, B. A.; Carter, D. R.; Hendrix, A.; Lenassi, M.; Langlois, M. A.; Llorente, A.; van de Nes, A. S.; Nieuwland, R.; Tang, V.; Wang, L.;

- Witwer, K. W.; Jones, J. C. Towards defining reference materials for measuring extracellular vesicle refractive index, epitope abundance, size and concentration. *Journal of Extracellular Vesicles* **2020**, *9*.
- (8) Kramberger, P.; Ciringer, M.; Štrancar, A.; Peterka, M. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for total virus particle determination. *Virology Journal* *2012* **9**, 1–10.
- (9) Nikitin, N.; Trifonova, E.; Evtushenko, E.; Kirpichnikov, M.; Atabekov, J.; Karpova, O. Comparative Study of Non-Enveloped Icosahedral Viruses Size. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0142415.
- (10) Steppert, P.; Burgstaller, D.; Klausberger, M.; Tover, A.; Berger, E.; Jungbauer, A. Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1487*, 89–99.
- (11) Roose-Amsaleg, C.; Fedala, Y.; Vénien-Bryan, C.; Garnier, J.; Boccara, A. C.; Boccara, M. Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. *Research in Microbiology* **2017**, *168*, 413–418.
- (12) Workman, R. E. et al. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome. *Nature Methods* *2019* **16**, 1297–1305.
- (13) De Coster, W.; Weissensteiner, M. H.; Sedlazeck, F. J. Towards population-scale long-read sequencing. *Nature Reviews Genetics* **2021**, *22*, 572–587.
- (14) McNaughton, A. L.; Roberts, H. E.; Bonsall, D.; de Cesare, M.; Mokaya, J.; Lumley, S. F.; Golubchik, T.; Piazza, P.; Martin, J. B.; de Lara, C.; Brown, A.; Ansari, M. A.; Bowden, R.; Barnes, E.; Matthews, P. C. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–14.

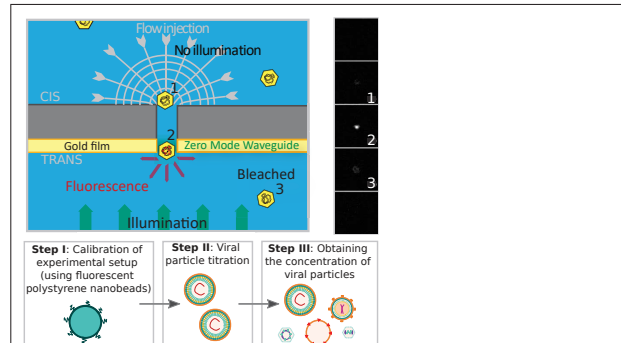
- (15) Radukic, M. T.; Brandt, D.; Haak, M.; Müller, K. M.; Kalinowski, J. Nanopore sequencing of native adeno-associated virus (AAV) single-stranded DNA using a transposase-based rapid protocol. *NAR Genomics and Bioinformatics* **2020**, *2*, 1–16.
- (16) Nguyen Quang, N.; Goudey, S.; Ségéral, E.; Mohammad, A.; Lemoine, S.; Blugeon, C.; Versapuech, M.; Paillart, J. C.; Berlioz-Torrent, C.; Emiliani, S.; Gallois-Montbrun, S. Dynamic nanopore long-read sequencing analysis of HIV-1 splicing events during the early steps of infection. *Retrovirology* **2020**, *17*, 1–24.
- (17) Stein, U.; Meller, A.; Rozevsky, Y.; Gilboa, T.; Van Kooten, X. F.; Kobelt, D.; Hutter, D. Quantification of mRNA expression using single-molecule nanopore sensing. *ACS Nano* **2020**, *14*, 13964–13974.
- (18) Farhangdoust, F.; Cheng, F.; Liang, W.; Liu, Y.; Wanunu, M. Rapid Identification of DNA Fragments through Direct Sequencing with Electro-Optical Zero-Mode Waveguides. *Advanced Materials* **2022**, *2108479*, 1–9.
- (19) Spitzberg, J. D.; Zrehen, A.; van Kooten, X. F.; Meller, A. Plasmonic-Nanopore Biosensors for Superior Single-Molecule Detection. *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1900422.
- (20) Klughammer, N.; Dekker, C. Palladium zero-mode waveguides for optical single-molecule detection with nanopores. *Nanotechnology* **2021**, *32*, 18LT01.
- (21) Harms, Z. D.; Haywood, D. G.; Kneller, A. R.; Selzer, L.; Zlotnick, A.; Jacobson, S. C. Single-particle electrophoresis in nanochannels. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 699–705.
- (22) Harms, Z. D.; Selzer, L.; Zlotnick, A.; Jacobson, S. C. Monitoring Assembly of Virus Capsids with Nanofluidic Devices. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9087–9096.
- (23) McMullen, A.; De Haan, H. W.; Tang, J. X.; Stein, D. Stiff filamentous virus translocations through solid-state nanopores. *Nature Communications* **2014**, *5*, 1–10.

- (24) DeBlois, R. W.; Wesley, R. K. Sizes and concentrations of several type C oncornaviruses and bacteriophage T2 by the resistive-pulse technique. *Journal of Virology* **1977**, *23*, 227–233.
- (25) Vogel, R.; Willmott, G.; Kozak, D.; Roberts, G. S.; Anderson, W.; Groenewegen, L.; Glossop, B.; Barnett, A.; Turner, A.; Trau, M. Quantitative Sizing of Nano/Microparticles with a Tunable Elastomeric Pore Sensor. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 3499–3506.
- (26) Yang, L.; Yamamoto, T. Quantification of virus particles using nanopore-based resistive-pulse sensing techniques. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*.
- (27) Cervera, L.; Gòdia, F.; Tarrés-Freixas, F.; Aguilar-Gurreri, C.; Carrillo, J.; Blanco, J.; Gutiérrez-Granados, S. Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2019**, *103*, 7367–7384.
- (28) Jouvenet, N.; Neil, S. J. D.; Zhadina, M.; Zang, T.; Kratovac, Z.; Lee, Y.; McNatt, M.; Hatziioannou, T.; Bieniasz, P. D. Broad-Spectrum Inhibition of Retroviral and Filoviral Particle Release by Tetherin. *Journal of Virology* **2009**, *83*, 1837–1844.
- (29) Voelkel, C.; Galla, M.; Maetzig, T.; Warlich, E.; Kuehle, J.; Zychlinski, D.; Bode, J.; Cantz, T.; Schambach, A.; Baum, C. Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 7805–7810.
- (30) Mougél, M.; Akkawi, C.; Chamontin, C.; Feuillard, J.; Pessel-Vivares, L.; Socol, M.; Laine, S. NXF1 and CRM1 nuclear export pathways orchestrate nuclear export, translation and packaging of murine leukaemia retrovirus unspliced RNA. *RNA Biology* **2020**, *17*, 528–538.
- (31) Salvetti, A.; Grève, S.; Chadeuf, G.; Favre, D.; Cherel, Y.; Champion-Arnaud, P.;

- David-Ameline, J.; Moullier, P. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Human Gene Therapy* **1998**, *9*, 695–706.
- (32) Paolini, L.; Zendrini, A.; Radeghieri, A. Biophysical properties of extracellular vesicles in diagnostics. *Biomarkers in Medicine* **2018**, *12*, 383–391.
- (33) Giannessi, F.; Aiello, A.; Franchi, F.; Percario, Z. A.; Affabris, E. The role of extracellular vesicles as allies of HIV, HCV and SARS viruses. *Viruses* **2020**, *12*.
- (34) LeClaire, M.; Gimzewski, J.; Sharma, S. A review of the biomechanical properties of single extracellular vesicles. *Nano Select* **2021**, *2*, 1–15.
- (35) Hoen, E. N.; Cremer, T.; Gallo, R. C.; Margolis, L. B. Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113*, 9155–9161.
- (36) DiMattia, M. A. et al. Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 6947–6958.
- (37) Crowther, R. A.; Kiselev, N. A.; Böttcher, B.; Berriman, J. A.; Borisova, G. P.; Ose, V.; Pumpens, P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **1994**, *77*, 943–950.
- (38) Levene, H. J.; Korlach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- (39) Zhu, P.; Craighead, H. G. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis. *Annual Review of Biophysics* **2012**, *41*, 269–293.
- (40) Auger, T.; Mathé, J.; Viasnoff, V.; Charron, G.; Di Meglio, J. M.; Auvray, L.; Montel, F. Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores. *Physical Review Letters* **2014**, *113*, 1–5.

- (41) Kavokine, N.; Netz, R. R.; Bocquet, L. Fluids at the Nanoscale: From Continuum to Subcontinuum Transport. *Annual Review of Fluid Mechanics* **2021**, *53*, 377–410.
- (42) Sedji, M. I.; Varbanov, M.; Meo, M.; Colin, M.; Mathieu, L.; Bertrand, I. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, *25*, 30497–30507.
- (43) Ye, Y.; Ellenberg, R. M.; Graham, K. E.; Wigginton, K. R. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environmental Science and Technology* **2016**, *50*, 5077–5085.
- (44) Bibby, K.; Peccia, J. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environmental Science and Technology* **2013**, *47*, 1945–1951.
- (45) Guerrero-Latorre, L.; Ballesteros, I.; Villacrés-Granda, I.; Granda, M. G.; Freire-Paspuel, B.; Ríos-Touma, B. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Science of the Total Environment* **2020**, *743*, 0–4.

TOC Graphic



Supporting Information:

**Optical Quantification by Nanopores of Viruses,
Extracellular Vesicles and Nanoparticles**

Léa Chazot-Franguiadakis¹, Joelle Eid², Marius Socol², Bastien Molcrette¹,
Philippe Guégan³, Marylène Mougél², Anna Salvetti⁴, and Fabien Montel^{1*}

¹ *Laboratoire de Physique, UMR CNRS 5672, ENS de Lyon, Université de Lyon, Lyon,
France*

² *Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, UMR CNRS 9004, Université de
Montpellier, Montpellier, France*

³ *Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 8232, Sorbonne Université, Paris,
France*

⁴ *Centre de Recherche International en Infectiologie, UMR CNRS 5308, Université de
Lyon, INSERM, Lyon, France*

E-mail: fabien.montel@ens-lyon.fr

S1. Material and Methods

Viral particles production

Human Immunodeficiency Virus (HIV-1)

Virus-like particles were obtained from monoclonal human HeLa cells stably expressing Gag-GFP. Green Fluorescent Protein (GFP, $\lambda_{exc} = 488nm/\lambda_{em} = 507nm$) was fused in C-terminal of Gag protein, and this was the same for MLV^[1]. On the other hand, non-producing HeLa cells were used to collect only extracellular vesicles (EVs). The samples were prepared as follow: both cell types were cultured at 37°C and 5% CO_2 in 10 cm plates containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). When the cells are 40-60% confluent ($\sim 3 \pm 0.6 \times 10^6$ cells), the medium was replaced by 10 mL F12 medium complemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). After 5, 24, 48 and 72 hours, the supernatants were harvested after gently pipetting up and down the culture medium on the adherent cells to detach virions, then filtered using a 0.45 μm filter to remove cellular debris (see more precision on HIV production in Ref^{[2][3]}). Some of the samples were directly analyzed, while others were concentrated by ultracentrifugation. This latter was done through a 20% sucrose cushion at 100,000 x g for 1h30 at 4°C. The virion pellets were resuspended in 100 μL of nanoparticles-free PBS and stored at -80°C to be analyzed.

Murine Leukemia Virus (MLV)

NIH3T3 mouse embryonic fibroblast cells expressing independently MLV-GFP and Gag-GFP, in addition to non-producing NIH3T3 cells were cultured at 37°C and 5% CO_2 in 10 cm plates containing DMEM. Infectious MLV were made fluorescent by inserting GFP into the gag gene which did not alter the properties of the virus^{[4][5]}. Two days after transfection, the supernatants were collected after gently pipetting up and down the culture medium on the adherent cells to detach all the virions, and filtered through a 0.45 μm filter. The supernatants collected from the same plates were divided into two groups: one group was

analyzed directly after filtration, and the second was ultracentrifuged before analysis with the same experimental method as for HIV samples.

Extracellular Vesicles (EVs)

EVs were harvested from culture medium of HeLa and NIH3T3 cells respectively infected or not with HIV and MLV following the same protocol as for the viruses. EVs containing media were filtered (0.45 μ m) and ultracentrifugated when high concentrations were required. Fluorescent marking was achieved using DiO (Cell Vybrant Cell Labelling, Molecular Probes, 1 mM in DMF, $\lambda_{exc} = 484nm / \lambda_{em} = 501nm$) or DiL (Cell Vybrant Cell Labelling, Molecular Probes, 1 mM in ethanol, $\lambda_{exc} = 549nm / \lambda_{em} = 565nm$) dye. DiO/DiL were diluted 200 times in the initial viral solution used to make range of diluted solutions. Labelling required incubation for 15 min at 37°C.

Hepatitis B Virus (HBV)

HBV capsids were purified from a viral stock of infectious HBV particles (genotype D) concentrated on a 20% sucrose cushion. For this, 1.8×10^{10} genome containing particles (measured by qPCR) were diluted in OPTIMEM complemented with a final concentration of 1% NP40/50 mM DTT/2mM EDTA, and then loaded on a mixed sucrose/ CsCl step gradient. After over-night ultracentrifugation at 50 KRPM fractions were collected and analysed by western blot using an antibody against the HBV Core protein and qPCR to detect the HBV genome. The positive fractions were pooled, and dialyzed against PBS. Fluorescent labelling was achieved using YOYO-1 (Molecular Probes, 1mM in DMSO, $\lambda_{exc} = 491nm / \lambda_{em} = 509nm$). YOYO-1 were diluted 1500 in the initial viral solution used to make range of diluted solutions. Labelling required incubation for 10 min at room temperature.

Adeno Associated Viruses (AAV)

Stocks of AAV-8 and AAV-9 recombinant particles expressing GFP were generated by calcium phosphate transfection of HEK-293 cells as described previously^[6]. The helper plasmids used for production were either pDG8 (a plasmid containing both the rep2-cap8 and the adenoviral helper genes) or a combination of pXX6^[7], and pAAV2/9 (a kind gift from X. Xiao, University of Pennsylvania, USA). They were cotransfected in HEK-293 cells together with the AAV2-CMV-GFP vector plasmid that encodes for GFP under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. Vector particles were purified on double CsCl gradient, dialyzed, and titered by quantitative PCR (qPCR)^[6]. AAV titers were in the range of 10^{12} to 10^{13} genome particles/mL. Fluorescent labelling was achieved using YOYO-1 according to the same procedure as for HBV.

All samples were stored at -80°C . Dilute solutions of viral particles in Tris-EDTA buffer (10mM Tris-KCl, 1 mM of EDTA, pH=7.5) were prepared. Serum Fetal Bovin (FSB) can be added to 10% (if no serum was present in the initial solution). Final solutions (in the range of 10^6 particles/mL, $50\mu\text{L}$) was filled in the cis chamber.

Other viral particle quantification methods used

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) was used to determine HIV, MLV and EVs sizes and concentrations. NTA was performed by using a NanoSight LM-10 instrument equipped with a blue laser 39 (488 nm) and NTA 2.0 software (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). The camera level and flow rate were adjusted manually, and three videos of 60 s were captured at room temperature. Each video was analyzed three times by using a set of optimized analysis parameters for virions detection, which were kept constant during all measurements. The apparatus was calibrated by using monodisperse fluorescent 100 nm beads (TetraSpek, $\sim 1.8 \times 10^{13}$ particles/mL). For HIV and MLV, GFP signal was used to

determined concentration and average size of the particles. For EVs, scattered light signal was used to determined concentration and average size of the particles.

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) was used to determine HBV and AAV expected concentration. For the quantification of viral stocks by qPCR, viral particles (either HBV or AAV) were first treated with DNase I for 30 min at 37°, C to degrade contaminating DNA, Viral/vectorDNA was then extracted using the Qiagen DNAeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's instructions and quantified by qPCR using primers recognizing either the HBV genome or the GFP cDNA (for AAV-GFP). A standard curve was established by using known amounts/copies of HBV or AAV plasmid DNA.

Calibration of experimental setup

Fluorescent carboxyl polystyrene nanobeads (*SPHEROTM* UV/Yellow, *Spherotech Inc*) of two batches were used in this study: NPs 1 ($\phi = 76 \pm 23nm$, 140nM) and NPs 2 ($\phi = 73 \pm 23nm$, 88nM). Sizes were measured by DLS equipment (DLS Zetasizer Nano-S, Malvern InstrumentTM). Dilute solutions of NPs in Tris-EDTA buffer (10mM if Tris-KCl, 1 mM of EDTA, pH=7.5) were prepared.

Nanoporous membranes

Track-etched membranes (Whatman, GE Polycarbonate) produced through heavy ion irradiation are commercially available dense arrays of cylindrical nanopores. Density, orientation and diameter of the nanopores wwere controlled. For this study, we used membranes that consisted of 10 μm -thick polycarbonate layers with pores of nominal diameter and density respectively equal to 400 nm and 1×10^8 pores/ cm^2 . They were coated with a thin layer of gold (EVA 300 Alliance Concept evaporator, thickness 50 nm, speed of deposit 0.1 nm/s)

in order to enable optical detection of translocation events. Effective diameters of the pore were checked by Scanning Electron Microscopy ($\Phi = 395 \pm 15nm$).

Zero-Mode Waveguide detection

Translocation events were recorded with a home-made near field optical setup based on the Zero-Mode Waveguide effect. The experimental set-up was a classical fluorescence microscopy experiment made of an inverted microscope(Axiovert 200) connected to an electron multiplying charge coupled device camera (EMCCD camera, Andor, iXon 897). In direct image capture, it displayed a maximum resolution of 512 x 512 pixels in 32 bits and a maximum frame rate of 60 Hz. On top of the microscope, a water objective (ZEISS C-Apochromat) with 63x magnification, 1.2 numerical aperture, and an operating distance of 0.28 mm for a 0.17 mm glass slide was mounted. As excitation source we used a laser (Cobolt blues 50, Cobolt AB), which emits at 473 nm wavelength. The heart of the setup was composed of two chambers (*cis/trans*) connected by a nanoporous membrane (see Article Fig.1(b)). By applying a pressure difference (0.5 ± 0.1 mbar) between chambers, particles were transported through the membrane in the *trans* chamber. The membrane was illuminated by an extended laser beam on the gold side, which induced an enhancement of fluorescence. Particles in the *cis* chamber and inside the pore were invisible because they were not in the illuminated volume. Eventually, the particles fluorescence disappeared because of bleaching and optical defocusing as they moved away from the membrane. This enabled to optically separate the fluorescence signal of translocating particles from particles in the bulk. Signal to noise enhancement in the vicinity of the nanopore end can be evaluated as a 8 to 20 factor depending on the type of metal used. The main advantages of this method are the ability to detect single particle translocation events through a wide range of nanoporous array (from silicon membranes to plastic membranes) and the ability to detect these events with a large parallelization (in our case 10^5 pores in parallel). Our measurements were performed in real

time and time resolution was determined by the acquisition frequency of the camera (30 ms for an Andor EMCCD iXon 897).

Image Analysis and Fitting Procedure

From 1 to 200 translocation events were observed on each movie (250 frames, 33 fps). After image background removal, the frequency of translocation was quantified using a manual counting and a homemade MATLAB script. Each point was recorded in quadruplet over 2-8 different experiments (total of 8-16 replicates), that were then averaged to obtain the results. The errors bars were determined from the 95% standard error ($\pm 2 \times \sigma / \sqrt{N}$ with σ the standard deviation and N , the number of measurements). The robustness of the fitting procedure was assessed by bootstrapping.

S2. Fluorescence labelling

As described previously, both particles with existing fluorescent label (as HIV and MLV) and particles without initial fluorescent label (as AAV, HBV and EVs) can be used. As for particles without initial fluorescent label, we used a one-step labelling procedure, which simply involved incubating the sample with a small volume of fluorophores ($< 1\mu L$) for a few minutes (10 to 15 min of incubation depending on the fluorophore). Moreover, by using several types of fluorophores, we were able to label a wide range of viruses as well as extracellular vesicles. Fig. [1](#) presents the different possibilities to label virus, distributed according to the Baltimore classification.

The fluorophores used were passive markers, without interaction with the nanopores and therefore they did not alter the translocation of the viral particles.

	Baltimore classification of virus						
	Group I (AAV) dsDNA	Group II ssDNA	Group III dsRNA	Group IV (+)ssRNA	Group V (-)ssRNA	Group VI (HIV) (+)ssRNA	Group VII (HBV) dsDNA
Non-enveloped virus (or virus whose envelope was removed)	Targeting viral genome using YOYO-1/ POPO-1 (dyes that are capable of crossing viral capsid)						
Enveloped virus	Targeting viral envelope using DiO/DiL (labelling of lipid bilayer) or use of dyes inherent to virus production (GFP, ...)						

Figure 1: **Baltimore classification of virus and fluorescent labelling.** The classification of Baltimore separates the viruses according to the nature of the viral genome (DNA or RNA, single or double stranded, polarity of the RNA (+) or (-)). Two major categories of fluorescent label can be used.

Fluorescence tests on YOYO-1

Experimental tests on fluorescent labelling using YOYO-1 dye were realized. YOYO-1 dye has a high affinity for nucleic acids, it exhibits over a thousand-fold increase in green fluorescence when bound to DNA, and it is also cell-impermeable^[8].

Here, we performed assays using YOYO-1 dye to test fluorescence labelling of our particles. We added to an EVs solution (concentration of 7.3×10^7 particles/mL) either DiO which labelled lipid bilayers or YOYO-1 which targeted nucleic acids. We wanted to verify that YOYO-1 marked the genetic material only if it was accessible. Then, we compared the number of translocation events observed in both cases. The results were presented in Fig. 2.

	Evs + DiO	Evs + YOYO-1
Concentration (particles/mL)	7.3×10^7	
Number of events	78 ± 4	1 ± 1

Figure 2: **Fluorescence tests on YOYO-1 dye.** The number of translocation events was presented for different samples (EVs and VLP HIV) and different labelling conditions. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{replica} > 8$ for each experimental series.

Almost no YOYO-1 related fluorescent event was observed in the case of EVs + YOYO-1. This was coherent with the fact that few cellular genetic material was present in the solution and that YOYO-1 was unable to diffuse through the lipid bilayer of EVs to reach potential

cellular genetic material.

Fluorescence enhancement and ZMW

Electromagnetic field enhancement modelling

The ZMW effect allows to reduce considerably the illumination volume in the case of fluorescence microscopy, thus allowing the observation of single molecules in fluorescence. Indeed, with this technique it is possible to isolate a single molecule in a nanopore (acting as a waveguide) and to induce its localized fluorescent emission thanks to a reduced observation volume. Modeling of ZMW has already been the subject of several simulations^[9-15] as well as experimental evidence in conditions identical to the ZMW setup used in this manuscript^[16]. Briefly, the propagation of an electric field in a metallic waveguide of cylindrical shape is governed by the Helmholtz equation:

$$(\nabla^2 + \mu\epsilon\frac{\omega^2}{c^2})\mathbf{E} = 0 \quad (1)$$

With μ and ϵ , respectively the permeability and permittivity of medium, ω the pulsation, c the speed of light in vacuum and \mathbf{E} , the electric component of the field.

The resolution of this equation shows the existence of a cut-off length (λ_c) below which the electric field is evanescent (hence the name Zero-Mode Waveguide). For $\lambda_m > \lambda_c$, the electric field intensity decreases exponentially with the penetration length according to a characteristic length Λ .

$$I(z) = |E(z)|^2 \propto e^{-z/\Lambda} \quad with \quad \frac{1}{\Lambda} = 2\sqrt{\frac{1}{\lambda_c^2} - \frac{1}{\lambda_m^2}} \quad (2)$$

With λ_m , the wavelength of electric field.

Some studies have put forward simulations of the electromagnetic field enhancement for geometries that can slightly differ from the one we used (regarding for example the nature of the metal layer or substrate). For instance, Kinkhabwala et al. have studied single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna^[9]. Using gold bowties (supported by an ITO substrate), they observe enhancements of a single molecule's fluorescence up to a factor of 1,340. Electromagnetic simulations detail radiative and non-radiative enhancement factors depending on the position in regard to the hole, which is a result of the enhancement of the intrinsic quantum efficiency. Moreover, the landmark work of Levene et al. offers a finite element simulation based on Maxwell's equations considering the geometry of a circular waveguide (formed by a well excavated in a nanoscale layer of aluminum deposited on a silica substrate)^[10]. The result of this simulation highlights the ZMW effect with a characteristic decreasing length for the light intensity in good agreement with theoretical predictions. Another example, is the computational study proposed by Tanii et al^[11]. They have analyzed by computational optics simulation, the excitation light and the fluorescence propagating from a molecule in a ZMW and the dependence of the signal-to-noise ratio on the ZMW structure (the geometry of the ZMW consists of a nanohole in an aluminum layer on a glass substrate). Other studies, such as the one of Wu et al. proposes both numerical simulation and experiments on the fluorescence enhancement in an over-etched gold ZMW^[12]. Both types of approach are in agreement regarding the fluorescence enhancement per molecule and the effective excitation volume of the Au-ZMW as a function of its radial size and over-etching depth.

Furthermore, we have studied and described the electromagnetic field enhancement and enhanced field volume, in our ZMW geometry in a previous article^[16]. In this article, we used the same experimental setup that in this current article, that is to say, pressure-driven

transport and optical detection of particles through track-etched membrane (Whatman, Nucleopore), covered with a 50nm-thick layer of gold. The results presented in our former article has shown that our illumination method is in the ZMW regime. Indeed, in our precedent article, we measured the exit process of DNA individual molecules as a function of the applied pressure for pore diameters of 50, 100 and 200 nm. Given the geometry of our system, if we were indeed in a regime specific to the ZMW, the illumination depth, δ , outside the pore should be proportional to the radius of the pore R (as demonstrated by previous work^[10]). Based on this hypothesis, the observation volume V_{obs} is then proportional to R^3 and the duration of an exit event came as:

$$\tau = \frac{R}{v} \quad (3)$$

with v , the speed of the flow.

According to Hagen-Poiseuille law (see section S3), the speed of the flow came as:

$$v = \frac{\Delta P}{R_h \cdot \pi \cdot R_p^2} \quad \text{with } R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4}. \quad (4)$$

ΔP and L , are respectively the applied pressure and the length of the pore, η , is water viscosity.

Therefore, the duration of an event can be simplified as:

$$\tau = \frac{8\eta L}{\Delta P R}. \quad (5)$$

We then plotted, the ratio $\eta L/R\tau$ as a function of pressure. All data collapse on a master curve which support the idea that our illumination method is indeed in the ZMW regime. All the results on this aspect are available in our previous article^[16].

The experimental conditions for the ZMW are identical, the only thing that differs is the type of biological particles studied: DNA molecules in the paper¹⁶ and viral particles in the present article. Therefore in terms of ZMW electromagnetic field enhancement and enhanced field volume, the conditions are identical, and the illumination method described here is in the ZMW regime.

Signal-to-noise ratio

Moreover, as indicated above, the principle of the ZMW effect is to allow a significant increase of the fluorescent signal in the vicinity of the gold metal layer and thus of the signal-to-noise ratio. We have performed some experiments to highlight the interest of ZMW for viral particles detection. For this purpose, we carried out experiments on the same membranes that we originally used (pores diameter 400 nm, Whatman, GE Polycarbonate) but without the gold nanometric layer. We then sought to determine (based on the same method that was described in the article) the concentration of two viral samples using these membranes without gold. Fig. 3 shows the results for an HIV sample (Fig. 3A) and for an AAV sample (Fig. 3B), in the two conditions (membrane with/without gold). For the same viral sample, less events were observed in the case where the membranes were not gold coated. The determined concentrations while using naked membranes were lower than the ones determined using membrane covered with gold. Therefore, we weren't able to determine correctly the concentration of viral particles without the gold layer.

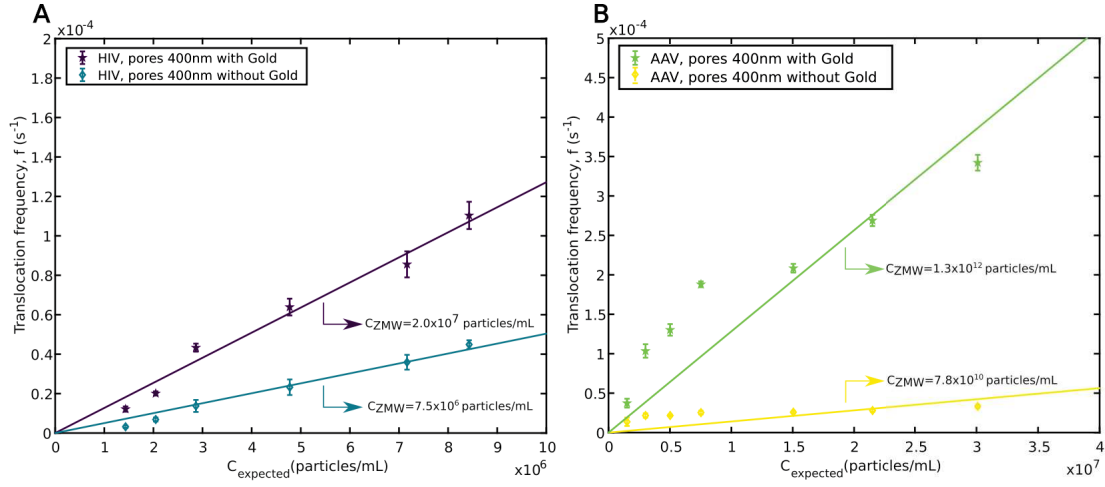


Figure 3: **Comparison of concentration determination for viral samples in the case of a nanoporous membrane with/without gold.** Translocation frequency was plotted as a function of $C_{expected}$, for A: HIV and B: AAV. The same viral sample was used for both experiences with and without gold and some dilutions were made in order to determine virus concentration. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{replica} > 16$ for each experimental series.

In addition, we have performed calculations highlighting the increase in fluorescence with the ZMW effect. For this purpose, we calculated the signal-to-noise ratio for both samples (HIV and AAV) and for both conditions (membrane with/without gold). The signal-to-noise ratios were definitely greater in the presence of the gold layer, as shown in the table of Fig.

4.

Signal-to-noise ratio	Nanoporous membrane With Gold layer (50 nm-thick)	Nanoporous membrane Without Gold layer
HIV	$7,1 \pm 0,2$ ($N=250$)	$2,0 \pm 1,0$ ($N=50$)
AAV	$2,0 \pm 0,4$ ($N=100$)	$1,2 \pm 0,6$ ($N=20$)

Figure 4: **Signal-to-noise ratio for HIV and AAV samples in two different conditions: nanoporous membrane with/without gold.** Signal-to-noise ratio was determined by dividing the maximum of intensity of an event by the intensity of the background. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar. Experimental errors were the standard error of the mean, and N is the number of events collected.

This can explain the incorrect determination of concentrations revealed above. Indeed,

in the case of a gold-free membrane, it was possible to miss events due to low signal-to-noise ratio. This was especially important for AAV, a small DNA labelled virus, where gold was indispensable to distinguish events.

Evolution of fluorescence intensity as a function of time

In our case, given the values mentioned in section S1 and equation (5), the duration of an exit event is about 8 ms. In the conditions we used, this duration is shorter than the time resolution of our system (30ms). Indeed, to be able to have a significant number of events we have been recording images of 512x512 pixels which covered 125x125 μm . However, time resolution can be improved by increasing binning and by reducing the observed area. By adapting these parameters (value of size parameters), we were able to optimize the temporal resolution of our detection system to 10 ms. Using these parameters, we have recorded videos and we have analyzed the fluorescence intensity of events as a function of time for AAV particles (labelled with YOYO-1). Results of flash pattern are presented in Figure 5.

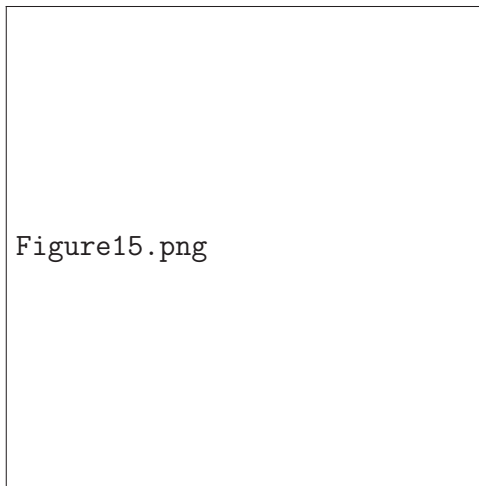


Figure 5: **Evolution of fluorescence of event as a function of time.** Normalized intensity was represented as a function of time for AAV (averaged on $N = ?$ events). Normalized intensity was obtained by divided intensity by the maximum intensity. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar.

S3. Concentration regime and real world sample

Concentration regime

Samples used in this work were complexes biological samples harvested directly from the production of infected cells. The samples did not encounter a purification step and were used straight from the cell medium. They were therefore highly concentrated (some of the samples can reach 10^{12} particles/mL, as it can be observed in Fig. 4 in the main article) and comparable to clinical samples.

Nevertheless, it should be mentioned that the experiments were always carried out in a diluted regime. Working in a diluted regime was valuable to avoid interactions of viruses with the pore. More precisely, we observed that the evolution of translocation frequency (f) as a function of concentration was linear for low concentrated samples. For more concentrated samples, a deviation from the linear regime was noticed. An example is shown in Fig. 6.

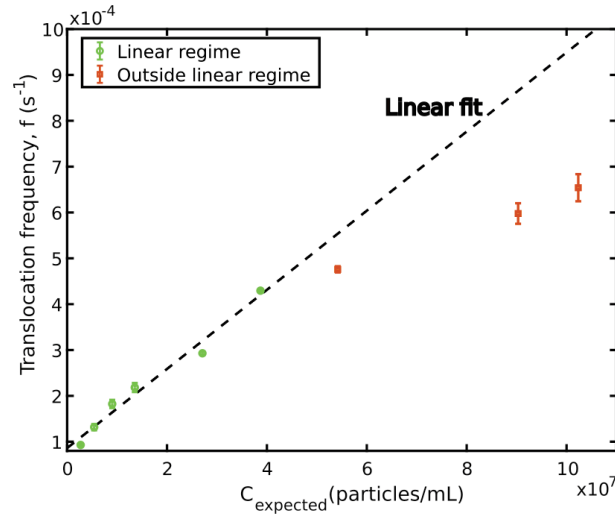


Figure 6: **Linear regime of concentration for an AAV sample labelled with YOYO-1.** Translocation frequency (f) as a function of expected concentration (C_{expected}). Each point corresponded to a different dilution of the same initial viral sample. A deviation from the linear regime was observed for the points with high concentrations (in orange). This deviation was due to interactions between the viruses and the pore. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{\text{replica}} > 16$ for each experimental series. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar.

This deviation was due to interactions between viruses and the pore, and potential detection mistakes when there are too many events. Therefore, we always performed measurements at low concentrations even for initially highly concentrated samples. For the latter, we added a dilution step and verified that they were in the linear regime. This point has been highlighted in Fig. 3 of the main article where: higher dilution ratios were used for concentrated sample and linearity was well verified.

River sample

We performed experiments on water coming from a river, since there is an ongoing need for direct counting of biotic nanoparticles such as viruses to probe the state of the river water. Water was collected in the Rhône at Lyon (France, 45°43'34.497" North, 4°49'14.402" East) on September 1st, 2021. To analyze the river water, we first filtered the sample through 0.45 μm pores. We then divided our sample into two parts and fluorescently labeled one of them with YOYO-1 and the other one with DiO. The protocols used were the same that described in supplements (Sections S1/S2). We then measured the translocation frequency for different dilution ratios of samples (originating from the same initial batch) through 400 nm pores. For both labeling (YOYO-1 and DiO), the particle translocation frequency (f) normalized by the particle translocation frequency for the initial sample (f_0) was represented as a function of the dilution ratio (r) on Fig. 7

f_0 was obtained by linear extrapolation from particle translocation frequency (f) when $r = 1$. Initial concentration can then be obtained using calibration coefficient α_{NP} , and the translocation frequency for the initial sample (f_0) relying on the following formula (as detailed in the main article, equation (1)):

$$C_{ZMW} = \frac{f_0}{\alpha_{NP}}, \quad (6)$$

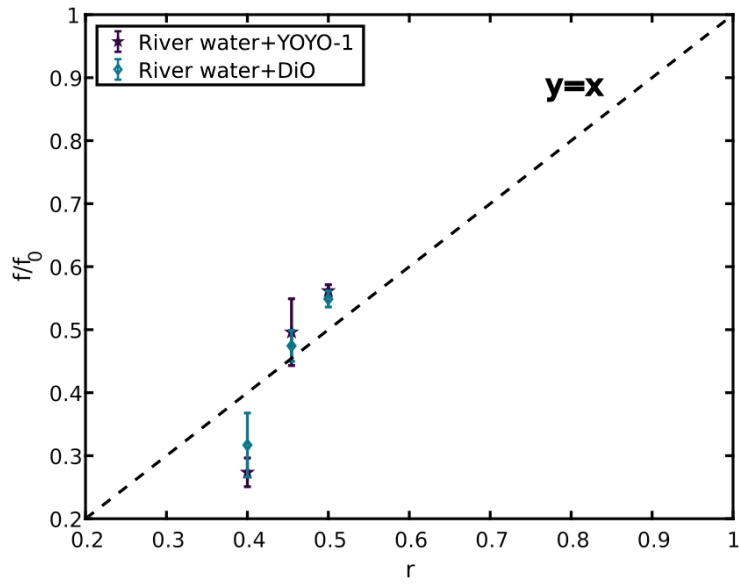


Figure 7: **Effect of dilution factor on frequencies of translocation for the same sample of river water labelled respectively with YOYO-1 (violet) and DiO (blue).** Translocation frequency (f) normalized by initial translocation frequency (f_0) as a function of dilution factor (r). For each fluorescent labeled type, different diluted solutions were made from the same initial sample. Pore diameter 400 nm, Applied pressure 0,5 mbar. Experimental errors were the standard error of the mean, and $N_{replica} > 16$ for each experimental series.

The concentrations obtained using the ZMW setup, were respectively 2.10^7 particles/mL for the YOYO-1 labelled sample and 4.10^7 particles/mL for the DiO labelled sample. Labelling with YOYO-1 allowed us to detect and quantify viruses without envelope such as phytoplankton double-stranded DNA viruses (Myovirus, Podovirus, Siphovirus)^[17] or even Adenovirus and Norovirus that can be found in river water^[18]. Whereas, labelling with DiO allowed us to detect and quantify both viruses with envelope (such as Herpesvirus, HIV, and Coronavirus including SARS-Cov2)^[19-21] and extracellular vesicles^[17]. The orders of magnitude of the concentrations that was found with our method agreed with the values given in literature for other rivers such as the Marne (in Paris France)^[17].

S4. Comparison of calibration with theory

Experimental coefficient α_{NP} obtained during calibration procedure of our experimental setup can be compared to theoretical coefficient. Indeed in a general framework, we can consider that the system was dominated by advection, since the Peclet Number was greater than one ($P_e = \frac{vL}{D} \sim 40$, with v the speed of the flow through a pore, L the length of the pore, D the diffusion coefficient), and that Hagen-Poiseuille law was valid. In this case, the flow through a single pore J , at applied pressure ΔP , can be expressed as follows:

$$J = \frac{\Delta P}{R_h}, \text{ with } R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4}, \quad (7)$$

R and L , respectively the radius and the length of the pore, η , water viscosity.

Therefore, the total number of particles, N_{tot} , at given concentration C , going through the area of the observed surface S , during an acquisition time t , came as:

$$N_{tot} = \frac{\Delta P \cdot N_A \cdot t \cdot \sigma \cdot S}{R_h} \cdot C \quad (8)$$

With σ the pore density and N_A the Avogadro number.

And the related total translocation frequency of nanobeads was:

$$f = \frac{\Delta P \cdot N_A \cdot \sigma \cdot S}{R_h} \cdot C, \quad (9)$$

Therefore, the theoretical coefficient, α_{theory} defined as $f = \alpha_{theory} \times C$, appeared as:

$$\alpha_{theory} = \frac{\Delta P \cdot N_A \cdot \sigma \cdot S}{R_h}, \quad (10)$$

We obtained $\alpha_{theory} = 3.0 \times 10^{-12} \pm 1.0 \times 10^{-12} \text{ mL} \cdot \text{particles}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. This value is closed to the one obtained experimentally ($\alpha_{NP} = 9.7 \times 10^{-12} \pm 0.7 \times 10^{-12} \text{ mL} \cdot \text{particles}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and validates our experimental calibration.

S5. Comparison with other existing techniques

In this section, we have presented a comparison of our method with other existing techniques. The specifications and limits were listed and compared between different techniques in Fig.

[8](#).

Compared to other available methods the main advantages of our strategy are that we achieved a low LOD and required a small volume of sample while keeping a short experimental duration and a specificity level that can be tuned by the final user. Our protocol involved only a short labelling step (10 min). The ability to measure the concentration in the single molecule regime also enabled to have information on the variability of the sample concentration. Indeed one run of the experiment (which included 8 measurements and took 1 min) led to an average concentration and a standard deviation.

	LOD (Limit of detection) (particles/mL)	Total experimental duration at LOD	Volume required (for LOD) (μL)	Single Molecule	Versatility & Specificity	Preparation steps
ELISA	10^8	24h	50	X	Specific antibody required	Multiple rinse steps
Western Blot	10^6	24h	400	X	Specific antibody required	Multiple rinse steps
qPCR	200	1h	50	X	Detection of viral genome only	Amplification steps
Light Diffusion	10^8-10^{10}	2h	15	✓	Detection of all objects (information on size only)	Filtration (pores $0,2\mu\text{m}$)
NTA	10^6	1h	600	✓	Detection of all objects (possibility to fluorescently label objects of interest +information on size)	Filtration (pores $0,2\mu\text{m}$)
Nanopore (electrical detection)	10^8	>1h	50	✓	Detection of all objects (fake translocation events, possibility to have an information on size)	Filtration (pores $0,2\mu\text{m}$)
Nanopore (ZMW)	$<10^5$	<15min	20	✓	Detection of fluorescent labelled particles only	One step fluorescent labelling

Figure 8: **Specifications and limits of viral particles quantification methods.**

References

- (1) Jouvenet, N.; Neil, S. J. D.; Zhadina, M.; Zang, T.; Kratovac, Z.; Lee, Y.; McNatt, M.; Hatzioannou, T.; Bieniasz, P. D. Broad-Spectrum Inhibition of Retroviral and Filoviral Particle Release by Tetherin. *Journal of Virology* **2009**, *83*, 1837–1844.
- (2) Nydegger, S.; Foti, M.; Derdowski, A.; Spearman, P.; Thali, M. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **2003**, *4*, 902–910.
- (3) Chamontin, C.; Rassam, P.; Ferrer, M.; Racine, P.-J.; Neyret, A.; Lainé, S.; Milhiet, P.-E.; Mougél, M. HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, 336–347.
- (4) Voelkel, C.; Galla, M.; Maetzig, T.; Warlich, E.; Kuehle, J.; Zychlinski, D.; Bode, J.; Cantz, T.; Schambach, A.; Baum, C. Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 7805–7810.

- (5) Mougél, M.; Akkawi, C.; Chamontin, C.; Feuillard, J.; Pessel-Vivares, L.; Socol, M.; Laine, S. NXF1 and CRM1 nuclear export pathways orchestrate nuclear export, translation and packaging of murine leukaemia retrovirus unspliced RNA. *RNA Biology* **2020**, *17*, 528–538.
- (6) Salvetti, A.; Grève, S.; Chadeuf, G.; Favre, D.; Cherel, Y.; Champion-Arnaud, P.; David-Ameline, J.; Moullier, P. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Human Gene Therapy* **1998**, *9*, 695–706.
- (7) Xiao, X.; Li, J.; Samulski, R. J. Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *Journal of Virology* **1998**, *72*, 2224–2232.
- (8) Günther, K.; Mertig, M.; Seidel, R. Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, 6526–6532.
- (9) Kinkhabwala, A.; Yu, Z.; Fan, S.; Avlasevich, Y.; Müllen, K.; Moerner, W. E. Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna. *Nature Photonics* **2009**, *3*, 654–657.
- (10) Levene, H. J.; Korlach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- (11) Tanii, T.; Akahori, R.; Higano, S.; Okubo, K.; Yamamoto, H.; Ueno, T.; Funatsu, T. Improving zero-mode waveguide structure for enhancing signal-to-noise ratio of real-time single-molecule fluorescence imaging: A computational study. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2013**, *88*, 3–4.
- (12) Wu, M.; Liu, W.; Hu, J.; Zhong, Z.; Rujiralai, T.; Zhou, L.; Cai, X.; Ma, J. Fluorescence enhancement in an over-etched gold zero-mode waveguide. *Optics Express* **2019**, *27*, 19002.

- (13) Moran-Mirabal, J. M.; Craighead, H. G. Zero-mode waveguides: Sub-wavelength nanostructures for single molecule studies at high concentrations. *Methods* **2008**, *46*, 11–17.
- (14) Zhu, P.; Craighead, H. G. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis. *Annual Review of Biophysics* **2012**, *41*, 269–293.
- (15) Punj, D.; Ghenuche, P.; Moparthi, S. B.; de Torres, J.; Grigoriev, V.; Rigneault, H.; Wenger, J. Plasmonic antennas and zero-mode waveguides to enhance single molecule fluorescence detection and fluorescence correlation spectroscopy toward physiological concentrations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2014**, *6*, 268–282.
- (16) Auger, T.; Mathé, J.; Viasnoff, V.; Charron, G.; Di Meglio, J. M.; Auvray, L.; Montel, F. Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores. *Physical Review Letters* **2014**, *113*, 1–5.
- (17) Roose-Amsaleg, C.; Fedala, Y.; Vénien-Bryan, C.; Garnier, J.; Boccara, A. C.; Boccara, M. Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. *Research in Microbiology* **2017**, *168*, 413–418.
- (18) Sedji, M. I.; Varbanov, M.; Meo, M.; Colin, M.; Mathieu, L.; Bertrand, I. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, *25*, 30497–30507.
- (19) Ye, Y.; Ellenberg, R. M.; Graham, K. E.; Wigginton, K. R. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environmental Science and Technology* **2016**, *50*, 5077–5085.
- (20) Bibby, K.; Peccia, J. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environmental Science and Technology* **2013**, *47*, 1945–1951.

- (21) Guerrero-Latorre, L.; Ballesteros, I.; Villacrés-Granda, I.; Granda, M. G.; Freire-Paspuel, B.; Ríos-Touma, B. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Science of the Total Environment* **2020**, *743*, 0–4.

Résumé

Le cycle de réplication du VIH-1 débute par l'entrée du virus dans la cellule hôte et s'achève par la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire. L'étape cruciale de libération virale reste peu étudiée car elle nécessite une étude à l'échelle de la cellule unique. En effet, la quantification de la production virale réalisée à partir de populations de cellules dont les cinétiques de réplication du VIH-1 sont très hétérogènes, donnerait des résultats approximatifs. C'est pourquoi nous avons développé une approche microfluidique qui permet d'étudier la dynamique du relargage du VIH-1 en temps réel à l'échelle de la cellule unique.

Les travaux réalisés durant ma thèse portent sur la combinaison de la virologie et la microfluidique continue afin de développer une technologie sensible et fiable pour visualiser et quantifier la production virale d'une cellule unique en temps réel. Trois types de puces ont été construites. La puce de capture nous a permis de déterminer les paramètres physiques et biologiques pour immobiliser une cellule (~10 µm) unique qui produit des VLP-GFP. La puce de détection, dont la performance a été comparée avec la technique du Nanoparticle Tracking Analysis, s'est avérée un outil précieux pour une quantification précise et reproductible de VLPs fluorescents (~140 nm) à l'échelle de la particule unique dans des surnageants de culture cellulaire. Et enfin, la puce multiplexe, qui couple les deux fonctions (capture de cellules uniques et détection de virus) m'a permis d'étudier la cinétique de relargage virale en temps réel, à l'échelle de la cellule unique. Des lignées HeLa et HEK 293 productrices de VLPs-GFP m'ont servi de modèles d'études. Pour la première fois la cinétique de production virale a pu être mesurée avec en moyenne 50 VLPs / cellule / h. Ce résultat a été validé par la mesure des virus produits par les mêmes cellules cultivées en boîte de culture, confirmant la fiabilité et la sensibilité de notre approche. De façon intéressante, le profil de la cinétique du relargage montre un processus périodique (période ~4min) qui pourrait être expliqué par la présence d'une ou de plusieurs étapes limitantes dans le mécanisme de biogenèse des virions. Les nouveaux outils développés ici apportent des informations inédites sur la cinétique du relargage du VIH-1. Ils pourront être utilisés ou facilement adaptés pour l'étude d'autres pathogènes ou des vésicules extracellulaires.

Abstract

Upon its entry, HIV-1 replicates and produces new viral particles that are released into the extracellular environment. The crucial step of virus release remains poorly understood because it requires the study at the single cell level. Indeed, quantification of viral production from cell populations with very heterogeneous HIV-1 replication kinetics would give approximate results. This is why we have developed a microfluidic approach that allows the study of HIV-1 release dynamics in real-time at the single cell level. In this study, continuous microfluidics was combined to the virology in order to develop a sensitive and reliable technology to visualize and quantify virus production by a single cell. Three types of chips were fabricated: the trapping chip allowed us to determine the physical and biological parameters that ensure single cell trapping (~10 µm) producing VLPs-GFP. The detection chip, whose performance was compared with the Nanoparticle Tracking Analysis technique, proved to be a valuable tool for accurate and reproducible quantification of fluorescent VLPs (~140 nm) at the single particle scale in cell culture supernatants. The multiplex chip, which combines the two previous chips, allowed us to study in real-time the virus release kinetics at the single cell scale. VLPs-GFP producing HeLa and HEK 293 cell lines were used as study models. For the first time, viral production kinetics could be measured with an average of 50 VLPs / cell / h that was validated by the measurement of viruses produced by the same cells grown in culture dish, confirming the reliability and sensitivity of our approach. Interestingly, the release kinetics profile shows a periodic process (period ~4min) that could be explained by the presence of one or more limiting steps in the virion biogenesis mechanism. The new tools developed here provide novel information on the kinetics of HIV-1 salting-out. They can be used or easily adapted for the study of other pathogens or extracellular vesicles.