UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

INSERM U1259 MAVIVH

THÈSE présentée par :

Stéphanie DURAND

soutenue le : **21 octobre 2021**

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

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

Suivi et localisation en milieu cellulaire des complexes formés entre la protéine Gag du VIH-1 et l'ARN génomique par microscopie électronique à transmission

THÈSE dirigée par :

Monsieur de ROCQUIGNY Hugues	Chargé de recherche HDR INSERM, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur MAUFFRET Olivier	Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay
Madame BERNACCHI Serena	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

---

JURY :

Monsieur MAUFFRET Olivier	Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay
Madame BERNACCHI Serena	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg
Madame MOUGEL Marylène	Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier
Monsieur LAMBERT Olivier	Directeur de recherche, CNRS, Université de Bordeaux
Monsieur MEREGHETTI Laurent	Professeur des Universités, Université de Tours Président du jury
Monsieur de ROCQUIGNY Hugues	Chargé de recherche HDR INSERM, Université de Tours

À Brigitte, Gilles et Alexandre

« Il faut avoir beaucoup étudié pour savoir peu »

Montesquieu, Pensées Diverses

Remerciements

Née d'un travail de longue haleine de quatre ans, cette thèse de doctorat est le fruit de mes recherches effectuées au sein de l'unité INSERM U1259 « Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites » à Tours. Ce travail scientifique et cette expérience d'une vie n'aurait pas été possible sans l'accompagnement et le soutien d'un grand nombre de personnes. Ce travail fut possible grâce au financement de l'**Université de Tours** durant mes trois premières années de doctorat ainsi que celui de **l'Agence Nationale de Recherche contre les Hépatites et le SIDA** durant ma quatrième année de thèse.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, **Serena Bernacchi**, **Olivier Mauffret**, **Marylène Mougel**, **Olivier Lambert** et **Laurent Mereghetti** pour leur expertise et l'évaluation attentive qu'ils ont bien voulu apporter à mes travaux de recherche au cours de la lecture de cette thèse.

Un énorme merci à mon directeur de thèse**, Hugues**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse sous ta direction, ce fut quatre années très enrichissantes et pleines de rebondissements ! J'espère avoir été à la hauteur de tes espérances et que le travail qu'on a accompli ensemble t'a convenu, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Un grand merci pour ton encadrement et tes encouragements sans failles et également pour tes « remises à l'heure des pendules » en début de thèse, qui se sont avérées après coup plus utiles que je ne l'aurais pensé… Merci pour tes conseils toujours avisés, ton savoir scientifique, ton expérience, ta rigueur et l'aide que tu m'as apportée. Je me souviendrais très longtemps de tes « Elle va bien ? » « Chère Stéphanie… » « Ton sixième sens féminin… », de ta façon de chercher quel est mon prénom (Sabine ? Charline ?) et tes soupirs quand quelque chose ne va pas dans le sens de ce que tu espérais. Je te souhaite beaucoup de belles choses pour l'avenir, de très beaux articles sur HBV et surtout énormément de belles balades en vélo !

Philippe, un grand merci pour la disponibilité dont tu fais preuve au quotidien, toujours accompagné de ta gentillesse et de ta bienveillance. Tu es présent pour chaque personne au sein de cette unité, il est très agréable de pouvoir travailler à tes côtés. Je te souhaite le meilleur pour les années à venir. Merci de ton aide précieuse dans la rédaction de l'article.

Denys, merci pour votre disponibilité mais également pour votre humour à toute épreuve, surtout quand il s'agit de me rappeler que je ne viens vous voir uniquement pour l'achat de cellules ou d'une nouvelle centrifugeuse… Merci également pour la rigueur dont vous faites preuve pour le laboratoire, promis nous portons nos blouses exemplairement.

Angélique, ma gestionnaire préférée, un grand merci pour ta bonne humeur, ta douceur et ta disponibilité pendant toutes ces années ainsi que tous tes compliments sur mes tenues, promis je te mets de côté ma garde-robe quand je m'en débarrasserais ! Une pensée également à **Sarah** et un grand merci pour la gentillesse dont tu as fait preuve à mon égard lors de mon arrivée en stage de M1.

Florian, dès le début de ma thèse, c'est toi qui m'as appris tous les us et coutumes de la culture cell', de la biomol et j'en passe ! Je ne te remercierais jamais assez pour ta présence, ton soutien et tes encouragements ! On en a passé du temps en microscopie ou en réunion HBV tous les deux (où d'ailleurs une de mes solutions pour trouver de l'argent vous avait bien scotché à votre siège avec Virgile… Je te laisse retrouver de quoi il s'agit…). Bien évidemment, je ne pouvais pas oublier de parler de ton sarcasme hors du commun ainsi que de ton gros côté râleur qui nous fait croire que tu en a marre de tes collègues. Tu ne peux plus nous le cacher, au fond on sait bien que tu es sympa et que tu ne peux plus te passer de nous ! Pour la peine, je t'enverrais bien une petite balle en mousse tiens… Je te souhaite une très belle continuation et plein de bonheur aux côtés de ton adorable petite famille. (PS : Ne refait pas toute ta maison en palettes…).

Julien, alias le roi de la MET, comment te remercier au mieux pour tout ce que tu m'as appris pendant ces années de thèse ? Tu m'as transmis de nombreuses connaissances en microscopie électronique, que j'espère mettre à profit dans ma future carrière. Un grand merci pour ta patience, tes précieux conseils et ta bienveillance à toute épreuve, même quand je détériorais du matériel si précieux (un coucou au couteau de diamant et au perfect loop…) ou quand je t'embêtais car mes coupes ne se passaient pas comme prévu. Tu es quelqu'un avec un très grand cœur et plein de gentillesse, avec qui j'ai pris plaisir à développer de nouvelles techniques ou tout simplement à partager une conversation autour de nos lectures de polars ou nos derniers tests jeux de société. Au plaisir de partager une bière en terrasse du bota ! Je te souhaite le meilleur pour la suite et surtout beaucoup de belles images de virus !

Jean-Christophe, je souhaiterais te remercier pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes deux stages de Master sous ta direction dans l'unité. Ce fut une très bonne expérience et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour ton soutien et d'avoir cru en moi !

Ah **Julie D**. ! Ma deuxième Maman (de stage) ! Qu'est-ce qu'on a pu rigoler pendant ces deux années de stages de Master et mes premières années de thèse (un petit peu de Nesquik pour bien démarrer la journée ?). Un grand merci à toi pour m'avoir encadrée de la meilleure façon qui soit lors de mes débuts au sein de l'U966 (on aurait presque oublié son premier nom), pour ta patience et les astuces manips que tu m'as transmises sous fond de « passe-moi le bzzzt bzzzt stp » (grâce à toi, le Western Blot et les IP n'ont plus eu de secret pour moi). J'ai eu plaisir à te voir évoluer et à partager tous ces bons moments ensemble, que ce soit un mojito, une conversation lecture ou encore une voie d'escalade un peu technique. Nos mercredis soir escalade vont me manquer… Je te souhaite plein de bonnes choses avec ta petite famille.

Anne B., un grand merci à toi également pour ta présence et ton encadrement lors de mes stages de Master. Ta gentillesse, ta douceur et ta bienveillance à toute épreuve font de toi une personne avec un très grand cœur, j'ai vraiment apprécié travailler en ta compagnie puis partager le bureau à côté du tien. Je te souhaite le meilleur pour la suite ainsi qu'à ta petite famille. PS : Tes délicieuses pâtisseries me manquent déjà !

Emmanuelle B., **Christophe**, **Philippe C.**, **Éric**, **Martine** et **Catherine**, je souhaite chaleureusement vous remercier pour votre bonne humeur et pour les conseils toujours avisés que vous avez pu m'apporter lors de ces années de thèse.

Manu, j'ai été ravie de faire ta connaissance pendant mon passage au sein de l'U966/1259 ! Tu es quelqu'un d'authentique, de si gentil au quotidien avec un petit côté foufou (que dis-je, une vraie pile électrique !) et tu m'as directement fait me sentir à l'aise au sein de l'unité dès mon arrivée en M1 (ça ne me rajeunit pas…). J'ai adoré travailler à tes côtés pendant ces années, tu es un peu le couteau suisse du labo, je ne compte même plus le nombre de fois où je t'ai appelée à l'aide et je t'en remercie infiniment ! Ta bonne humeur et nos sorties vélo, fête foraine, roller vont me manquer ! Je te souhaite tout le meilleur pour ton avenir.

Julie M., quel plaisir d'avoir fait ta connaissance ! Tu es quelqu'un de formidable avec le cœur sur la main. Merci de ta gentillesse et de tes conseils toujours avisés. Qui aurait cru que nous aurions eu autant de points communs, surtout concernant le maquillage ahah. J'espère que l'on continuera d'échanger sur les dernières nouveautés make-up ☺. Nous avons passé de très bons moments, autour d'un verre, d'un brunch, d'une balade. Ce fut un plaisir de faire ma première sortie OVS à tes côtés, en espérant qu'il y en ait d'autres ! Je te souhaite plein de bonheur dans la suite de tes projets.

Alain, mon dieu de la biomol ! Qu'est-ce que j'aurais fait sans toi avec toutes mes constructions à réaliser ? Je me le demande… Un grand merci pour ta patience, ta disponibilité, ta gentillesse et ta persévérance à toute épreuve. J'ai adoré travailler à tes côtés durant ma thèse, surtout quand je venais t'embêter à coups de « Diiiiis moi Alain !... » et que j'obtenais pour première réponse « Moi… » !! Quel humour ! Vos discussions hautement philosophiques avec Florian me manqueront.

Elodie, un grand merci à toi pour ta disponibilité, ta bienveillance et ta gentillesse. Tu es toujours d'une aide précieuse pour les doctorants de l'unité, surtout en termes d'organisation, de rigueur et de recul scientifique. Merci de m'avoir écoutée à plusieurs reprises, tes qualités humaines font de toi une personne agréable à côtoyer et auprès de qui il est agréable de se tourner pour obtenir des conseils avisés. Je te souhaite beaucoup de belles choses pour la suite, et surtout une bonne santé.

Romu, le maitre des clés, ce fut un plaisir de partager l'open space avec toi ! Ta bonne humeur, ton dynamisme et ton humour bien beauf comme on les aime font de toi un collègue aux côtés de qui on apprécie évoluer.

Mélanie, merci à toi pour ton sourire toujours présent, ainsi que ton rire que l'on reconnaitrait entre mille quand on arrive à Dut ! Je te souhaite plein de bonheur aussi bien professionnellement que personnellement,

Marianne, quel plaisir d'avoir fait ta connaissance pendant ma thèse ! Un grand merci pour tous tes conseils, ta confiance et ton aide lors de mes candidatures de thèse et mes recherches de postdoc. Ce fut un plaisir de partager des moments au labo ou à l'extérieur avec toi. Ta bonne humeur et ton humour vont me manquer ! Je te souhaite énormément de belles choses pour la suite et surtout de beaux jours heureux dans ton deuxième chez toi, le P3 !

Amélie, un grand merci pour ta douceur, ta gentillesse et ton oreille toujours attentive. Tu es quelqu'un de très bienveillant que j'ai pris énormément de plaisir à côtoyer pendant ces années, On aura bien rigolé dans le labo ou au bureau ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, j'ai confiance, la chance va tourner.

Clara, merci pour ta gentillesse et les bons moments que l'on a passé ensemble, Je te souhaite des jours heureux à Trousseau !

Un grand merci à tous les membres de la plateforme de microscopie du CHU pour votre bonne humeur et votre accueil chaleureux, c'était ma deuxième maison. Merci **Isabelle** pour ta gentillesse sans faille, malgré nos mails de réservation à répétition. Merci **Pierre-Ivan** de m'avoir formé au confocal et pour tous les conseils sur le microscope électronique. **Sonia**, merci pour ta bienveillance et tes conseils. Tu es quelqu'un d'adorable que j'ai pris plaisir à côtoyer. **Marie**, un grand merci pour ta gentillesse, ton côté pétillant et ta bonne humeur au quotidien, Nos conversations autour des dernières sorties cinéma vont me manquer ! Merci à **Juliette** de m'avoir formée à la préparation des échantillons au début de ma thèse, grâce à toi les coupes classiques n'ont plus de secret pour moi. **Fabienne**, un grand merci à toi pour ta douceur, ta bienveillance et tous ces jolis moments à discuter de ta petite Billie ! **Christine**, merci pour tes conseils avisés. Excuse-moi de t'avoir autant fait râler avec la roue dans le réfrigérateur ! **Rustem**, merci de ta bonne humeur russe contagieuse et bon courage dans la suite de tes projets, Merci aux derniers arrivés. **Florentine** et **Guy**, pour votre sourire quotidien et votre gentillesse.

Roxane, je te remercie pour ta gentillesse et pour tous les tris de cellules que tu as pu me faire au cours de cette thèse. Tu m'as grandement facilité la tâche lors de la recherche de cellules positives au microscope électronique. **Clovis**, un grand merci pour le développement des calculs de distance et le temps que tu y as consacré, cela a apporté un véritable plus à mon travail de thèse.

Merci à **Marc-Florent** et **Leslie** pour votre aide précieuse avec les statistiques de cette thèse ! La non mathématicienne que je suis vous en est très reconnaissante. Bon courage pour la suite de ta thèse Marc-Florent.

Merci à tous les doctorants de l'unité, cette thèse a été plus facile grâce à vous et ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. **Elsa**, ma mexicaine préférée, un grand merci pour ta gentillesse, ta joie de vivre, tes paroles toujours réconfortantes et tous les petits moments passés ensemble, autour d'un brunch ou d'un jeu de société ! Tu as été une très belle rencontre pendant cette thèse et je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière et de ta vie perso. **Jade**, merci à toi pour tous ces bons moments passés au labo, tes dédicaces dans mon agenda toutes plus originales les unes que les autres et pour les grosses rigolades que l'on a eues, surtout après 18h (quoique de plus en plus tôt avec les années…) ! Il faut vraiment que l'on fasse un livre d'or de tous les post-it que l'on a accumulé, il y a des pépites (Oh des canards ! / Tiens un pipetboy…). Une pensée toute particulière pour le Biotechnocentre que nous avons partagé, on se souviendra longtemps de l'intervention de l'âne ! Nos moments de pause avec un muffin à la myrtille du relay H vont me manquer, tout comme t'entendre dire « J'ai faim moi ! » une bonne dizaine de fois par jour, **Yannick**, notre représentant breton de l'U1259, merci pour ces moments bien sympa qu'on l'on a passé autour d'une bière ou pour les conseils photo partagés ! Je me souviendrais

longtemps de tes arrivées au labo le matin avec une tête pas fraiche post-soirée. Je te souhaite beaucoup de belles choses pour la suite de ta carrière et bon courage pour la dernière ligne droite de ta thèse. Et ne t'en fais pas, un jour tu réussiras à bronzer ;-). **Séb**, merci beaucoup pour ta bienveillance, ta douceur, tes conseils toujours avisés et pour les mots gentils que tu sais toujours avoir. Merci aussi pour ton humour graveleux bien caché qui m'a bien fait rigoler ! Je te souhaite le meilleur pour la suite. **Virgile**, aka Jackie Rat (désolée, j'étais obligée !), on a fait vivre un sacré challenge à Hugues pendant ces années de thèse, passer d'HIV à HBV entre ses deux thésards, la tâche ne devait pas être évidente. Si on m'avait dit que celui qui était tout réservé à son arrivée en M2 était en fait aussi fifou, j'avoue que je n'y aurais pas cru. Merci pour ta bonne humeur, ton humour à toute épreuve, ton soutien lors des moments compliqués du thésard et surtout pour tes talents de dessinateur et chanteur ahah ! The Voice n'attends plus que toi. Et surtout, merci d'avoir souvent égayé mes journées avec notre escalade à la connerie (bacs de glaces, dessins au marqueur, les murs que tu m'as fait manger (Dédicace à la comparaison avec Depardieu quand j'ai vu le mur de Dutrochet de très près…)) et le nombre de noms d'oiseaux dont tu m'as glorifié)… Ce fut une sacrée bataille, dont on ne sait toujours pas qui sera le grand vainqueur ! Merci à **Anne Be** pour ta bonne humeur omniprésente et ton rire dont je me souviendrais longtemps ! Merci d'avoir été mon acolyte pour toujours plus embêter Virgile. Tes délicieuses pâtisseries vont me manquer, surtout le fameux brownie de Cyril Lignac dont tu maitrises si bien la recette ! Bon courage pour la fin de ta thèse, may the macrophages be with you ;-) Et si la bio ne te comble plus, n'oublie pas que tu as un avenir tout tracé dans rillettes ! **Thomas**, je te remercie pour ton aide pour le téléchargement de publis (en toute légalité bien évidemment) et pour ton humour graveleux mêlé à un bon fond de patois berrichon. C'était appréciable d'avoir quelqu'un au labo qui connaît la signification d'un « agat d'iau » ou de « tazonner » ahah. Beaucoup de courage pour la suite de ta thèse et surtout pour les PCR nichées et les midiprep !

Merci à nos post-doc qui n'ont jamais été aussi nombreuses ! **Charline**, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ces bons moments passés ensemble. Ton dynamisme et ton côté très pétillant font de toi une personne agréable à côtoyer. Je te souhaite le meilleur à la Réunion. **Mathilde**, merci beaucoup pour ta gentillesse et ta positivité ! J'ai apprécié être ta voisine de bureau durant ces dernières années de thèse. **Nancy**, merci pour ta joie de vivre et tes « Et Salut Stéphanie ! » à chaque fois que je passais à Dut, cela mettait du soleil dans mes journées ☺. **Lorena**, merci pour ta bonne humeur, tes conseils manips et les mots si gentils que tu as eu pour moi ! J'espère que je ne t'ai pas traumatisée avec mes arrivées un peu brutales dans le sas du L2 ;-)

Merci également aux anciens thésards du labo **Thibault**, **Karl**, **Maxime, Baptiste** et **Julien M**. J'ai vraiment apprécié évoluer à vos côtés lors de mon stage de Master et au début de ma thèse. Beaucoup de belles choses pour vos carrières respectives, Mention spéciale pour Aurélie et Florentin, avec qui j'ai passé de très bons moments au labo et à l'extérieur. **Aurélie**, ma copine VIH ! Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et ton sourire omniprésent ! J'ai adoré évoluer à tes côtés de mon M2 jusqu'à la fin de ta thèse. Gros regret de ne pas avoir pu aller au Coldspring ensemble, cela aurait pu être génial de partager ce congrès toutes les deux (Merci le Covid…) ! Je garderais un très bon souvenir de nos moments entre copains à l'extérieur, que ce soit à la guinguette, autour d'une raclette d'anniversaire ou de tes cris lors des sorties accrobranche ! Je te souhaite le meilleur pour ton avenir professionnel, que ce soit dans les sciences, l'immobilier ou la cosmétique maison ;-). **Florentin**, quel plaisir d'avoir partagé toutes ces années au labo depuis mon M1 ! Je suis ravie d'avoir assisté à ton évolution et de te

voir maintenant si bien t'épanouir dans ton postdoc à Lyon ! Merci pour tous ces bons moments et d'avoir souvent organisé des sorties labos entre collègues (Ne t'en fais pas, j'ai assuré ta relève). Mention spéciale pour notre apprentissage du ski ensemble à Super Besse (« Aaaah mais je vais tomber là, ça va trop vite ! ». Merci aussi pour ton humour détonnant et pour tes blagues graveleuses dont je me souviendrais encore longtemps, j'ai tellement rigolé à tes côtés ! J'espère qu'on aura l'occasion de rester en contact !

Petite pensée pour les stagiaires de M2 qui sont passés par le labo au cours de ces dernières années : **Marie-Alice**, **Ronan**, **Leslie**, **Émilie**, **Vincent**, **Camille**, **Julien** et **Maryam**, Bon courage pour la suite de vos parcours, en thèse ou non.
Merci aussi **Clara E.**, ce fût un plaisir de t'encadrer lors de ton stage de M1, tu es une stagiaire comme on aimerait en avoir tout le temps ! Bon courage pour la fin de ta thèse ! ☺

Un grand merci à tout le **département de Microbiologie** de la faculté de Sciences. Merci à **Agnès Petit** de m'avoir donnée l'opportunité de vous rejoindre le temps de quelques années, à **Gwendoline** pour ton aide lors de TP mais également à **Aurélia Hiron**, **Emilie Camiade**, **Catherine Dupuy** et **Denis Rasschaert**, j'ai pris un grand plaisir à découvrir l'enseignement à vos côtés.

Merci à tous mes amis, sans votre présence et votre soutien, cette thèse aurait été plus compliquée à traverser sans vous. **Marie**, ma BBF ahah, déjà 14 ans qu'on évolue côte à côte dans nos petites vies respectives accompagné de toutes nos péripéties et j'en suis plus que ravie. Tu as été un vrai pilier pendant toutes ces années, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour tout, d'être une si bonne amie, pour ton soutien inébranlable, pour tes bons conseils et ta patiente à m'écouter parler de ma thèse ces dernières années ahah ! **Manon**, ma Manolène du lycée que j'ai retrouvée en L3 Bio, tu m'as toujours épaulée dans mes choix et soutenue ! Tu connais bien le monde de la recherche, merci de t'être toujours intéressée à ce que je fais et de m'avoir encouragée ! Mon trio de base BioAc, merci à vous d'être présents dans ma vie depuis le BTS (Qu'elle épreuve ! De bons souvenirs !) et de croire en moi. **Auriane**, ma APEF, merci d'être présente pour moi depuis nos stages chez Servier et d'être une amie si fidèle quoi qu'il arrive. Tu as toujours les mots justes, des conseils avisés dans mes moments de doute. Tu es toujours d'un soutien précieux, surtout dans ces dernières années de thèse bien riches en émotions ! Surtout merci de ta présence lors de la réaction de cette thèse et de m'avoir remotivée quand c'était nécessaire. Tu es comme un tiramisu, quand on enlève le cacao du dessus, on découvre le meilleur ;-) Les boys, **Dylan** et **Corentin**, merci pour tous ces bons moments qui m'ont bien changé les idées et les fous rires qui vont avec ! Promis, j'essayerais de parler de la perspective de cheval lors de ma soutenance ! ;-) **Justine**, ma poule favorite depuis les débuts du collège ahah ! Qu'est-ce que ma vie serait triste sans toi et ta joie de vivre ! Merci pour tous ces bons moments qui m'ont fait oublier la thèse l'espace d'un instant !

Pour terminer, merci à ma famille, vous êtes mes piliers, rien n'aurait été possible sans vous. Merci à mes deux fantastiques grands-pères, **Paul** et **Serge**, pour votre soutien lors de nos appels hebdomadaires ! Même si ce que je fais devais être un peu abstrait pour vous, vos « Ça va ton travail ? » m'ont fait chaud au cœur. Une pensée toute particulière à **Mémé Dédette** et **Mémé Marcelle**, avec qui j'aurais adoré partager ces quatre années de ma vie. Je pense à fort vous. Merci à mon merveilleux **Tonton Frédéric** pour tes encouragements, ton soutien moral et pour les balades en

moto qui m'ont l'espace d'un instant sorti la tête de ma thèse ! J'espère un jour passer dans un des reportages Arte que tu regardes ahah ! Un énorme merci à **Maman** et **Papa**, les meilleurs parents que j'aurais pu imaginer, pour votre amour, votre présence, votre soutien dans ce doctorat mais aussi dans toutes les épreuves que j'ai traversé, je n'aurais pas fait tout ça sans vous. Vos encouragements m'ont été très précieux. Je sais que vous ne compreniez pas toujours ce que je vous racontais, donc je vous remercie d'avoir écouté mes complaintes, mes moments de joie mais aussi d'avoir toujours su trouver les bons mots pour me remotiver ! Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez soutenue dans mes choix d'études. Maman, quel plaisir de t'avoir fait t'intéresser aux sciences et à la médecine, une grande victoire pour moi ! Merci aussi pour ton aide dans la relecture de cette thèse, et d'avoir toujours veillé à ce que j'écrive bien le français. Papa, merci de m'avoir accompagnée sans relâche aux quatre coins de la France pour divers oraux, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi. Nos discussions musique et vinyls m'ont également permis de me changer les idées de nombreuses fois. Enfin, merci à mon loulou **Alexandre** pour ta bonne humeur, ta présence et ton soutien ! Un petit frère en or comme on en fait peu. On trinquera bientôt à nos diplômes respectifs !

Résumé

Durant l'assemblage du VIH-1, les protéines Gag nouvellement synthétisées se lient spécifiquement à l'ARN génomique viral (ARNg), entrainant la formation de petits complexes nucléoprotéiques. Consécutivement, des molécules additionnelles de Gag sont recrutées et ces complexes s'accumulent progressivement la membrane plasmique où l'assemblage et le bourgeonnement sont finalisés. Les précédents travaux publiés sur l'assemblage du VIH-1 ont essentiellement été réalisés par différentes approches de microscopie optique. Ils soulignent que des complexes Gag-ARNg se forment dans le cytoplasme et à la membrane plasmique et que le domaine NC de Gag est essentiel à leur formation et à leur traffic cellulaire. Les travaux réalisés durant cette thèse ont porté sur le suivi et la localisation cellulaire de Gag et de l'ARNg à haute résolution par microscopie électronique à transmission. Ces deux composants viraux forment majoritairement des complexes dans le cytoplasme puis migrent en direction de la membrane plasmique où des particules virales sont formées, dont environ un quart contiennent de l'ARNg. Une analyse morphométrique des complexes a permis de mettre en évidence que la distance entre Gag et l'ARNg diminue durant leur transport vers la membrane plasmique, souvent accompagné d'une augmentation de l'ARNg encapsidé. Des mutations ponctuelles dans les doigts de zinc du domaine NC provoquent une augmentation des distances entre Gag et l'ARNg ainsi qu'une diminution de l'ARNg encapsidé. Inversement, la délétion de la tige-boucle SL1 de l'ARNg n'empêche pas l'encapsidation de l'ARNg tandis que la délétion des deux tiges-boucles SL1-SL3 de l'ARNg est suffisante pour diminuer significativement la formation des complexes et l'encapsidation de l'ARNg. La formation de ces complexes est indépendante de la capacité de Gag à s'ancrer dans la membrane plasmique et du recrutement de la machinerie ESCRT par le domaine p6. Enfin, diverses approches de microscopie corrélative ont été expérimentées afin de relier une colocalisation de Gag et de l'ARNg à l'ultrastructure cellulaire entourant ces complexes. L'ensemble de ces travaux a permis de visualiser et de détecter à haute résolution et pour la première fois la formation de complexes nucléoprotéiques formés de Gag et de l'ARNg du VIH-1 de suivre finement leur évolution spatio-temporelle. Cette étude fourni une vision supplémentaire du processus d'assemblage viral en milieu cellulaire, rendant possible la localisation cellulaire abritant ces étapes du cycle du VIH-1.

Mots-clés : VIH-1, Assemblage, Gag, ARN génomique, Microscopie Électronique à Transmission

Abstract

The present view of HIV-1 assembly stipulates that newly made Gag precursor molecules kick-start virus assembly upon binding to the viral genomic RNA (gRNA), causing the formation of low-order oligomeric ribonucleoprotein complexes. Consequently, more Gag molecules are recruted and these complexes gradually accumulates at the plasma membrane of the infected cell to complete viral assembly and budding. Previous studies on HIV-1 assembly have been performed using optical microscopy techniques. They underline that Gag-gRNA complexes are formed in the cell cytoplasm and at the plasma membrane. Gag NC domain is essential for their formation and their cellular trafficking. In this work, the intracellular localization of these complexes was tracked and studied by transmission electron microscopy. Formation of these viral clusters seem to occur soon after the nuclear export of the gRNA and this is followed by a traffic toward the plasma membrane where viral particles are formed, one quarter containing gRNA. A morphetrical analysis of these complexes show that during their transport to the plasma membrane, the distance between Gag and gRNA decreases together with an increase of gRNA packaging. Point mutations in the GagNC zinc fingers caused an increase in the distance between Gag and the gRNA together with a large decrease of the packaged gRNA into virions. Conversely, deletion of the gRNA-SL1 does not interfere with gRNA packaging while deletion of SL3 is sufficient to decrease but not abolish Gag-gRNA cluster formation and gRNA packaging. The formation of these complexes is neither dependent of Gag ability to anchor in the plasma membrane nor of ESCRT machinery recruitment by p6. Finally, some correlative microscopy techniques have been used in order to link a colocalisation phenotype between Gag and gRNA with the surrounding cell ultrastructure. All this work sheds new light on HIV- 1 assembly and allow for the first time a high-resolution visualization and detection of nucleoproteic complexes formed by HIV-1 Gag and gRNA in a cellular context all along with a fine quantitative analysis. This original approach could be used to study other viral assembly models or more generally RNA/protein interactions.

Key words: HIV-1, Assembly, Gag, gRNA, Transmission Electron Microscopy

Table des matières

Remerciements…….. 7
Résumé……15
Abstract……... 17
Table des matières……19
Liste des abréviations…….. 23
Liste des figures……... 27

INTRODUCTION…….....31

Partie 1 : Généralités sur le virus de l'Immunodéficience Humaine…….....33

1. Historique de la découverte du VIH…… 33
2. Classification, diversité et variabilité génétique du VIH ……33
3. Origine du VIH……35
4. Contexte épidémiologique actuel……37
5. Transmission et physiopathologie du VIH-1…….....39
   - 5.1. La phase aiguë…….....40
   - 5.2. La phase chronique……..... 41
   - 5.3. Le SIDA…… 42
6. Prévention et contrôle de l'infection par le VIH……..42
   - 6.1. Prévention…… 42
   - 6.2. Traitements antirétroviraux et recherche vaccinale……...42
7. Caractéristiques du VIH-1…….....…… 44
   - 7.1. Structure de la particule virale……...44
   - 7.2. Organisation génétique……..45
   - 7.2.1. Le génome viral……..45
   - 7.2.2. Les protéines de structure…….....46
   - 7.2.3. Les enzymes virales…….....47
   - 7.2.4. Les protéines régulatrices…….....47
   - 7.2.5. Les protéines auxiliaires……48
8. Cycle de réplication du VIH-1…….……49
   - 8.1. Les étapes précoces…….... 50
     - 8.1.1. Attachement aux cellules cibles, entrée et tropisme viral……. 50
     - 8.1.2. Décapsidation et transcription inverse…….. 52
     - 8.1.3. Intégration du génome viral…….. 55
   - 8.2. Étapes tardives…….....57
     - 8.2.1. Transcription de l'ADN proviral…….....57
     - 8.2.2. Épissage et export nucléaire des ARNm…….....58
     - 8.2.3. Traduction des protéines virales……60
     - 8.2.4. Assemblage des particules virales …… 60
     - 8.2.5. Bourgeonnement et relargage des particules virales……. 63
     - 8.2.6. Maturation des particules virales…….....64

Partie 2 : Assemblage du VIH-1 et interaction de la protéine Gag avec l'ARN génomique viral……..... 66

1. Structure détaillée du précurseur Gag…… 66
   - 1.1. Le domaine MA……68

1.2. Le domaine CA……70
1.3. Le peptide SP1…… 71
1.4. Le domaine NC……72
1.5. Le peptide SP2……..75
1.6. Le domaine p6…….. 75
2. Structure détaillée de la région 5' non-traduite de l'ARN génomique…… 76
2.1. Le motif TAR……..... 77
2.2. Le motif poly(A) …… 77
2.3. Le motif PBS…… 78
2.4. La tige-boucle SL1……..... 78
2.5. La tige-boucle SL2……..... 78
2.6. La tige-boucle SL3……..... 79
2.7. La tige-boucle SL4……..... 79
3. Dimérisation de l'ARN génomique……. 79
4. Conformations du 5'UTR…… 81
5. Traffic de l'ARNg…….…….....82
6. Mécanisme détaillé de l'assemblage du VIH-1…….…….. 83
6.1. Oligomérisation de Gag…….. 84
6.2. Liaison de Gag aux acides nucléiques…… 85
6.2.1. Encapsidation préférentielle de l'ARNg…….....85
6.2.2. Domaines de Gag et de l'ARNg impliqués dans l'encapsidation…….. 87
6.2.3. Encapsidation des ARN viraux épissés et cellulaires……..... 89
6.3. Assemblage de Gag à la membrane plasmique…….....90
7. Régulation potentielle de l'assemblage du VIH-1 par les domaines NC et CA……... 90

OBJECTIFS……93

MATERIEL ET METHODES……..97

1. Plasmides……...99
2. Culture cellulaire…….100
3. Transfections……...……100
4. Anticorps…….100
5. Lyse des cellules……. 101
6. Concentration des particules virales…….....101
7. SDS-PAGE et Western-Blot……..... 101
8. Marquage immunofluorescent…… 102
9. Hybridation *in situ* par fluorescence……..... 102
10. Microscopie confocale…… 103
11. Tri cellulaire……103
12. Préparation des cellules pour la microscopie électronique à transmission selon la méthode Tokuyasu…….104
13. Immunomarquage par des nanoparticules d'or et observation au microscope électronique à transmission…….104
14. Microscopie corrélative à fluorescence et électronique à transmission (CLEM) par MET classique…….. 105
15. Microscopie corrélative à fluorescence et électronique à transmission (CLEM) par congélation haute pression et substitution à froid…….....106
16. Analyse morphométrique des nanoparticules d'or……..108

17. Hybridation in situ par microscopie électronique à transmission……..... 108
18. Analyses statistiques……..... 109

RESULTATS…… 111

Partie 1 : Étude de la formation des complexes Gag-ARNg par analyse quantitative et microscopie électronique à transmission dans des cellules HeLa…….....113

1. Localisation de Gag et de l'ARNg par microscopie confocale et MET…… 113
2. Visualisation des associations de Gag avec ARNg dans le cytoplasme et à la membrane plasmique en fonction du temps par microscopie confocale et MET…….. 118
3. Analyse quantitative des clusters Gag-ARNg……..122
4. Détection de Gag et de l'ARNg par une autre technique……125
5. Étude du lien entre formation des clusters Gag-ARNg et liaison de Gag à la membrane plasmique……..…….. 127
6. Étude de l'implication du domaine NC dans la formation des clusters Gag-ARNg…….. 130
7. Étude de l'implication des résidus aromatiques des doigts de zinc de la NC dans la formation des clusters Gag-ARNg……...131
8. Étude de l'implication des résidus aromatiques des doigts de zinc de la NC dans la formation des clusters Gag-ARNg……...134
9. Étude du lien entre formation des clusters Gag-ARNg et le recrutement de la machinerie ESCRT par le domaine p6……...137
10. Étude de l'implication du 5'UTR de l'ARNg dans la formation des clusters Gag-ARNg…….. 138

Partie 2 : Utilisation des connaissances développées en microscopie dans d'autres problématiques scientifiques du laboratoire……..…..…..…..…..…..…..…..…..…….. 141

Partie 3 : Étude de l'expression de Gag et de l'ARNg par microscopie corrélative…….....142

1. Détection de la protéine Gag-miniSOG par CLEM……142
2. Détection de la protéine Gag-miniSOG dans un contexte de génome complet par CLEM……..145
3. Marquage de la protéine Gag sur une résine hydrophile……147
4. Détection de la protéine Gag et de l'ARNg par CLEM…….. 148

DISCUSSION ET PERSPECTIVES…….....151

BIBLIOGRAPHIE……...161

ANNEXES……207

Annexe 1……209
Annexe 2……247
Annexe 3……267

Liste des abréviations

aa	Acide Aminé
ABC	*ATPase Binding Cassette*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALIX	*ALG-2 Interacting Protein X*
APOBEC	*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*
ARN	Acide Ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine Triphosphate
BMH	*Branched Multiple Hairpain*
CA	Capside
CCR5	*C-C Chemokine Receptor type 5*
CD4	Cluster de Différenciation antigène 4
CDC	*Center for Disease Control*
CLEM	*Correlated Light and Electron Microscopy*
CMH-I / II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité 1 / 2
CRF	*Circulative Recombinant Form* / Forme Recombinante Circulante
CRM1	Chromosome Maintenance Region 1
CTD	*C-Terminal Domain* / Domaine C-Terminal
CXCR4	*C-X-C Chemokine Receptor type 4*
CypA	Cyclophiline A
DIS	*Dimer Initiation Site*
DLS	*Dimer Linkage Signal*
eGFP	*enhanced Green Fluorescent Protein*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
Env	Enveloppe
ESCRT	*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*
Gag	*Group-specific antigen*
GALT	*Gut Associated Lymphoid Tissu*
GFP	*Green Fluorscent Protein*
Gp	Glycoprotéine d'enveloppe
HBR	*Highly Basic Region*
HeLa	Henrietta Lacks
hnRNPA2	*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2*
HSH	Homme ayant des relations Sexuelles avec des Hommes
Ig	Immunoglobuline
IN	Intégrase
IPMC	*Intracellular Plasma Membane-connected Compartments* / Compartiments Intracellulaires liés à la membrane plasmique
IST	Infection Sexuellement Transmissible

kDa	Kikodalton
LDI	*Long Distance Interaction*
LTR	*Long Terminal Repeat* / Longue séquence répétée
MA	Matrice
MCP	*MS2 Coat Protein*
MET	Microscopie Électronique à Transmission
MHR	Région d'Homologie Majeure
miniSOG	*mini Singlet Oxygen Generator*
MLV	*Murine Leukimia Virus* / Virus de la leucémie murine
MP	Membrane Plasmique
MST	Maladie Sexuellement Transmissible
MVB	*Multi Vesicular Bodies* / Corps Multivésiculaires
NC	Nucléocapside
Nef	*Negative factor*
NLS	*Nuclear Localisation Signal* / Signal de Localisation Nucléaire
NTD	*N-Terminal Domain* / Domaine N-Terminal
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	*Open Reading Frame* / Cadre ouvert de lecture
PBS	*Primer Binding Site* / Site de fixation des amorces
PCR	*Polymerase Chain Reaction* / Réaction de polymérisation en chaine
PIC	*Pre-Integration Complex* / Complexe de pré-intégration
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate
PBS	*Primer Binding Site*
Pol	Polymérase
PolyA	Site de polyadenylation
Pr	Protéase
Prep	*Pre Exposure Prophylaxis*
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RE	Réticulum Endoplasmique
Rev	*Regulator of viral expression*
RRE	Rev Response Element
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT	*Reverse Transcriptase* / Transcriptase inverse
SHRNP	*Staufen 1 HIV-1-dependent ribonucleoprotein complex*
SL	*Stem Loop* / Tige boucle
SIDA	Syndrôme d'Immunodéficience Acquise
SIV	*Simian Immunodeficiency Virus* / Virus de l'Immunodéficience Simienne
TA	Température Ambiante
TAR	*Trans-Activation Response element*
TASP	*Treatment As Prevention*
Tat	Transactivateur de la transcription
TM	Transmembranaire
TROD	Tests Rapides d'Orientation Diagnostique
TS	Travailleurs du Sexe

UDI	Usagers de Drogues Injectables
UTR	*Untranslated Region* / Région transcrite non-traduite
Vif	*Viral Infectivity Factor*
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP	Virus Like Particule
Vp	Viral Protein
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U
ZF	*Zinc Finger* / Doigt de zinc
WB	Western Blot

Liste des figures et des tables

Figure 1 : Distribution mondiale des sous-types du VIH-1 et des formes recombinantes…..34
Figure 2 : Évolution des relations phylogénétiques entre les lignées du VIH-1, du SIVcpz et du SIVgor…….....36
Figure 3 : Résultats de l'objectif 90-90-90 en 2020……39
Figure 4 : Progression de l'infection naturelle par le VIH-1…….. 40
Figure 5 : Cinétique de la phase aiguë l'infection par le VIH-1 et classement des différents stades selon Fiebig……..41
Figure 6 : Représentation schématique d'une particule virale mature du VIH-1……45
Figure 7 : Organisation génomique et protéines du VIH-1……46
Figure 8 : Étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1……50
Figure 9 : Représentation schématique des étapes de l'entrée du VIH-1……51
Figure 10 : Étapes détaillées de la transcription inverse du VIH-1……54
Figure 11 : Étapes détaillées de l'intégration de l'ADN du VIH-1 dans le génome cellulaire.....53
Figure 12 : Étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1…… 57
Figure 13 : Représentation non-exhaustive des différents transcrits et des sites d'épissages du VIH-1……59
Figure 14 : Voies d'export nucléaire des ARNm du VIH-1……59
Figure 15 : Représentation du traffic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppes du VIH-1……61
Figure 16 : Représentation de modèles potentiels d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1……..... 62
Figure 17 : Mécanisme de bourgeonnement du VIH-1……...64
Figure 18 : Étapes de la maturation protéolytique du VIH-1 et réarrangements morphologiques…….....65
Figure 19 : Représentation schématique de la polyprotéine Gag, de sa structure à haute résolution et des domaines la composant……..67
Figure 20 : Structure tridimensionnelle des monomères et trimères du domaine MA du VIH-1 et liaison à la membrane plasmique……. 68
Figure 21 : Structure tridimensionnelle du domaine CA et architecture de la capside mature du VIH-1……71
Figure 22 : Réarrangement conformationnel du peptide SP1 lors de l'assemblage du VIH-1…….... 72

Figure 23 : Structure tridimensionnelle de la NCp7 du VIH-1 et de son interface avec les acides nucléiques…… 73
Figure 24 : Structure tridimensionnelle du domaine p6 du VIH-1……..76
Figure 25 : Structure secondaire de la région 5'UTR de l'ARNg du VIH-1……..... 77
Figure 26 : Mécanisme de dimérisation de l'ARNg du VIH-1 et structure tridimensionnelle du dimère…….....80
Figure 27 : Modèles des structures secondaires du 5'UTR de l'ARNg du VIH-1 favorisant la traduction du génome ou la dimérisation et l'encapsidation du génome ……..... 82
Figure 28 : Représentation des étapes successives de la multimérisation de Gag durant l'assemblage viral et implication des différents domaines. …….. 83
Figure 29 : Représentation simplifiée de l'assemblage du VIH-1 induit par l'interaction entre la protéine Gag et l'ARN génomique.……...86
Figure 30 : Changements conformationnels de la protéine Gag du VIH-1 pendant l'assemblage viral.…….....91
Figure 31 : Découpe de la résine Epon…… 106
Figure 32 : Schéma détaillé de la structure de l'ARNg-MS2-Δenv…….....114
Figure 33 : Préparation des cellules pour MET par Tokuyasu et marquage immunogold……...115
Figure 34 : Optimisation de l'immunomarquage avec des nanoparticules d'or……116
Figure 35 : Expression de la protéine Gag, de l'ARNg-MS2-Δenv et de la protéine MCP-eGFP- NLS par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission…… 117
Figure 36 : Visualisation de Gag et de l'ARNg-MS2-Δenv en fonction du temps par microscopie confocale et par MET……119
Figure 37 : Analyse des complexes Gag/ARNg et de l'encapsidation de l'ARNg en fonction du temps…….. 122
Figure 38 : Détection de la protéine Gag et de l'ARNg du VIH-1 dans les cellules HeLa par FISH……...…… 126
Figure 39 : Détection de l'ARNg du VIH-1 dans les cellules HeLa par hybrididation *in situ* en MET. ……... 127
Figure 40 : Représentation des constructions WT et mutées utilisées dans cette étude……127
Figure 41 : Niveau d'expression intracellulaire et extracellulaire de la protéine Gag et de ses dérivés…… 128

Figure 42 : Visualisation de la colocalisation entre Gag-G2A et ARNg par microscopie confocale et des clusters formés par MET……. 129
Figure 43 : Impact de la délétion du domaine NC ou des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET……..... 131
Figure 44 : Impact des mutations des résidus aromatiques des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET…….....133
Figure 45 : Impact des mutations des résidus histidines des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET…….....136
Figure 46 : Visualisation de la colocalisation entre Gag-Δp6 et ARNg par microscopie confocale et des clusters formés par MET……..……138
Figure 47 : Impact des mutations de la région 5'UTR de l'ARNg sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET……...……...139
Figure 48 : Accumulation de particules virales du VIH-1 formées de la protéine Gag-miniSOG dans le milieu extracellulaire……..……144
Figure 49 : Accumulation de particules virales du VIH-1 formées de la protéine Gag-miniSOG dans des vésicules endosomales……..……... 145
Figure 50 : Expression des protéines Gag et Gag-miniSOG dans le cadre de l'expression du génome complet du VIH-1 en cellules HeLa……..……..146
Figure 51 : Expression et marquage de la protéine Gag dans des cellules HeLa incluses en résine K4M……..…….. 148
Figure 52 : Expression de l'ARNg du VIH-1 et de la protéine Gag-mCherry dans des cellules HeLa……..……..149

Table 1 : Amorces utilisées pour amplifier les séquences par PCR ou pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée.……..……100
Table 2 : Déshydratations des cellules dans des bains d'éthanol de concentration croissante……..105
Table 3 : Programme appliqué pour la substitution à froid et l'inclusion en résine K4M des cellules.……..……..107
Table 4 : Analyse de la colocalisation de Gag et de l'ARNg du VIH-1 selon la région mutée.……...120
Table 5 : Analyse des clusters Gag-ARNg du VIH-1 selon la région mutée par mesure des distances entre Gag et l'ARNg et évaluation de l'encapsidation de l'ARNg dans les virus.. …….. 124

INTRODUCTION

Partie 1 : Généralités sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. Historique de la découverte du VIH

C'est aux États-Unis, en juin 1981, que le CDC décrit pour la première fois de rares cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* associées à des candidoses chez des patients homosexuels masculins (Friedman-Kien, 1981; Gottlieb et al., 1981). Les premières personnes atteintes étant homosexuels, la maladie est nommée le *gay-related immunodeficiency disease* (GRID) par certains. Cependant, les autorités sanitaires se rendent rapidement compte que d'autres publics sont touchés, tels que les hétérosexuels, les hémophiles, les usagers de drogues injectables et les transfusés, ce qui entraine la création du terme Syndrome d'Immunodéficience Humaine Acquise (SIDA) par le CDC.

En France, c'est à la fin de l'année 1982 qu'une équipe dirigée par le professeur Montagnier à l'Institut Pasteur met en évidence que les patients atteints de la maladie présentent une diminution de leur taux de lymphocytes T CD4. Le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), l'agent éthologique responsable du SIDA, est identifié en 1983 suite à l'isolation du virus dans les ganglions lymphatiques d'un patient atteint d'une lymphadénopathie cervicale. Cette découverte a été récompensée par un prix Nobel de Médecine en 2008. Le virus fût initialement nommé "LAV", pour "Lymphadenopathy Associated Virus", faute d'informations suffisantes pour confirmer que ce virus était l'agent causal du SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983). Ce nouveau virus est différent du HTLV-1, premier rétrovirus humain découvert quelques années plus tôt. En 1986, un second virus moins virulant et également reponsable du SIDA est identifié par l'Institut Pasteur chez deux patients portugais, le VIH-2 (Barin et al., 1985; Clavel et al., 1986).

2. Classification, diversité et variabilité génétique du VIH

Le VIH-1 est classé en quatre groupes selon sa diversité génétique et leur répartition géographique est très différente (Hemelaar, 2012; Mourez et al., 2013). Le groupe M (Major) qui fût le premier découvert en 1983 est responsable de la pandémie mondiale (Barré-Sinoussi et al., 1983). Le groupe O (Outlier) a été découvert en 1990 chez deux patients originaires d'Afrique centre-ouest (De Leys et al., 1990) et est endémique en Afrique du Centre et de l'Ouest. Le groupe N (New ou non-M non-O) fût identifié en 1998 chez une femme Camerounaise (Simon, François, Philippe Mauclère, Pierre Roques, Ibtissam Loussert-Ajaka, Michaela C. Müller- Trutwin, Sentob Saragosti, Marie Claude Georges-Courbot, Françoise Barré-Sinoussi, 1998) et est responsable de moins d'une centaine d'infections en Afrique de l'Ouest et Centrale. Enfin, le groupe P fût mis en évidence en 2009 au Cameroun (Plantier et al., 2009).

La dissémination mondiale du VIH est due à sa forte variabilité génétique générant des sous-types variés. Cette diversité génétique résulte de deux principaux mécanismes : l'introduction fréquentes de mutations dans le génome viral et la recombinaison virale (Smyth et al., 2012). Le premier mécanisme s'explique par les erreurs commises par la transcriptase inverse, qui ne possède pas d'activité de relecture/correction lors de la transformation de l'ARN viral en ADN (Roberts et al., 1988). Il a été décrit que la transcriptase inverse possède un taux de mutation d'environ 1,4 x 10^{-5} mutations/paire de base/cycle de réplication (Abram et al., 2014) mais ce taux peut aller jusqu'à 4 x 10^{-3} mutations/base/cellule *in vivo* (Cuevas et al., 2015). Les mutations peuvent également être le fruit de l'action de facteurs cellulaires mutagéniques, tels que la famille d'enzymes APOBEC (Smyth et al., 2012). Le second mécanisme se produit lors de la co-infection d'une cellule par deux virus ou plus, où la transcriptase inverse peut utiliser les deux génomes viraux pour créer un nouveau virus composé d'un génome chimérique. Ces mécanismes conduisent à la formation rapide de populations virales génétiquement différentes chez chaque individu infecté. Les séquences virales chez un individu peuvent varier jusqu'à 10% (Keele et al., 2008).

Avec l'avancée de la pandémie, les séquences de chaque groupe du VIH-1 se sont considérablement diversifiées, ce qui a abouti à la création d'une classification. Pour le groupe M, neuf sous-types existent, désignés par les lettres A-D, F-H, J et K (Figure 1).

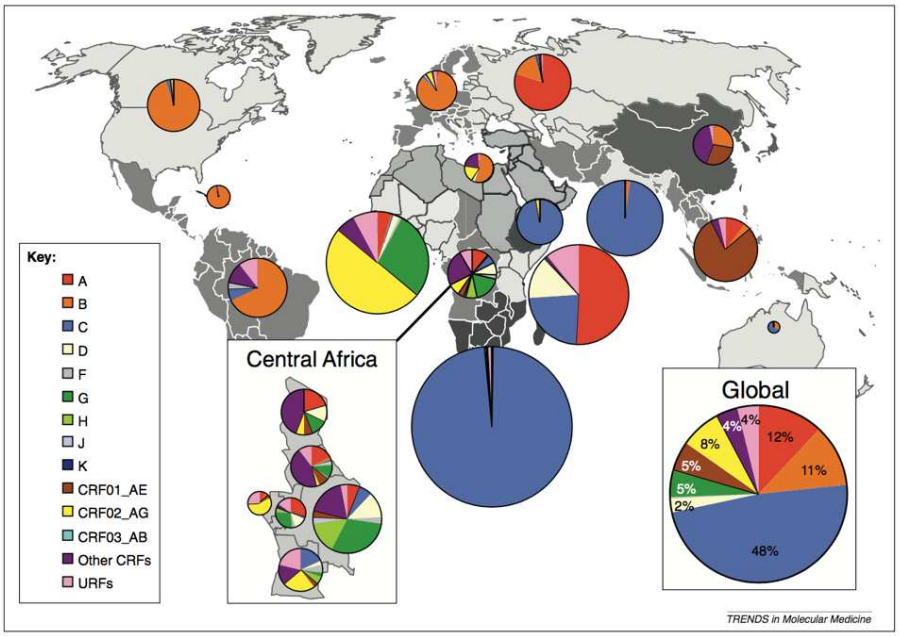


Figure 1 : Distribution mondiale des sous-types du VIH-1 et des formes recombinantes.
La distribution mondiale des sous-types et des formes recombinantes majeures du VIH-1 du groupe M sont représentées par les différentes couleurs dans l'encart à gauche de la figure. Les diagrammes à secteurs représentent la répartition du nombre de personnes infectées par les différents sous-types dans le monde (encart à droite de la figure) et en Afrique Centrale (encart au milieu de la figure) (D'après Hemelaar, 2012).

Le sous-type C, qui représente à lui seul la moitié des infections est retrouvé en Afrique Centrale, du sud, Sub-Saharienne et en Asie. Le sous-type B est principalement retrouvé en Europe, en Amérique du Nord et plus faiblement en Amérique du Sud et est récemment devenu le sous-type majoritaire dans le monde. Le sous-type A est majoritairement retrouvé en Europe de l'Est et en Asie Centrale. Les autres sous-types, plus faiblement repartis sont notamment détectés en Afrique (Hemelaar, 2012) (Figure 1). Le groupe O possède une grande diversité qui a mené à la création des sous-types I à V. À l'inverse, tous les virus du groupe N retrouvés chez l'homme sont proches, de même que les deux séquences du groupe P.

Le VIH- 2, qui est beaucoup moins virulent et non-pandémique est responsable de 1 à 2 millions de cas en Afrique de l'Ouest (Reeves and Doms, 2002). Il est classé en neuf groupes génétiquement distincts (A-I). Les groupes A et B sont les seuls endémiques et sont retrouvés majoritairement en Afrique de l'Ouest (Visseaux et al., 2016). De très rares cas ont été détectés en Europe, en Inde et aux États-Unis (Campbell-Yesufu and Gandhi, 2011).

En plus des sous-types décrits précédemment, l'existence de plusieurs sous-types circulant dans une même zone géographique, associé à la co-infection d'un patient par deux sous-types viraux différents peut mener à une recombinaison entre les deux génomes viraux (Ramirez et al., 2008). Le résultat de ce processus abouti à l'apparition de formes circulantes recombinantes (CRFs), si elles sont retrouvées chez trois individus ou plus non liés épidémiologiquement. Les CRF sont nommés par leur ordre de découverte et portent une extension indiquant de quelle forme pure elles proviennent. Si le CRF provient de plus de trois sous-types différents, l'extension « cpx » pour complexe est ajoutée (Hemelaar et al., 2011). En 2020, un total de 102 CRFs sont recensées par la base de données Los Alamos (https://www.hiv.lanl.gov/). Si la forme recombinante crée ne correspond pas aux critères d'un CRF et ne se disperse pas dans la population, il s'agit d'une forme unique recombinante (URF).

3. Origine du VIH

De multiples événements de transmission zoonotique du Virus de l'Immunodéficience Simienne (SIV) provenant de primates non-humains à l'homme ont abouti à la formation de plusieurs linéages du VIH en Afrique Centrale et de l'Ouest. Ces transmissions inter-espèces se sont probablement produites lors du contact avec du sang de singes lors d'activités telles que la chasse ou leur préparation et consommation en tant que viande de brousse. Une autre possibilité est la capture de ces primates et leur utilisation comme animaux de compagnie, favorisant leur rapprochement avec l'homme (Hemelaar et al., 2011). Une fois que la barrière d'espèce est franchie, de nombreux facteurs

biologiques (facteurs de restriction cellulaire et capacités réplicatives chez les nouveaux hôtes), environnementaux, sociologiques, démographiques, comportementaux ou médicaux (injections, transfusions…) ont facilité la dissémination épidémique du virus dans les populations humaines.

La découverte en 1989 d'un SIV proche du VIH-1, le SIVcpz*Ptt* qui circule chez les chimpanzés *Pan t. troglodytes* en Afrique Centrale et de l'Ouest serait le virus simien le plus proche du VIH-1. Des analyses phylogénétiques des séquences des souches du VIH-1 et du SIV ont montré que les groupes M et N du VIH-1 proviennent d'une transmission indépendante du singe à l'homme du SIVcpz*Ptt* (Keele, 2006; Mourez et al., 2013). En 2006, la découverte d'un SIV infectant les gorilles (SIVgor) a permis, de mettre en évidence des évènements de transmission entre le chimpanzé et le gorille. Un lien phylogénétique avec SIVgor a été démontré pour les groupes O et P du VIH-1 (D'arc et al., 2015; Hemelaar et al., 2011). Ces groupes proviendraient ainsi d'évènements de transmissions indépendants des gorilles à l'humain. Cela semble être le scénario le plus probable pour le groupe P, mais il ne peut pas être exclu que le groupe O provient d'une transmission des chimpanzés directement à l'homme, ainsi qu'aux gorilles (Mourez et al., 2013). Enfin, les groupes A à I du VIH-2 proviennent du SIVsmm provenant du petit singe Sooty mangabey *Cercocebus atys* (Hirsch et al., 1989; Reeves and Doms, 2002).

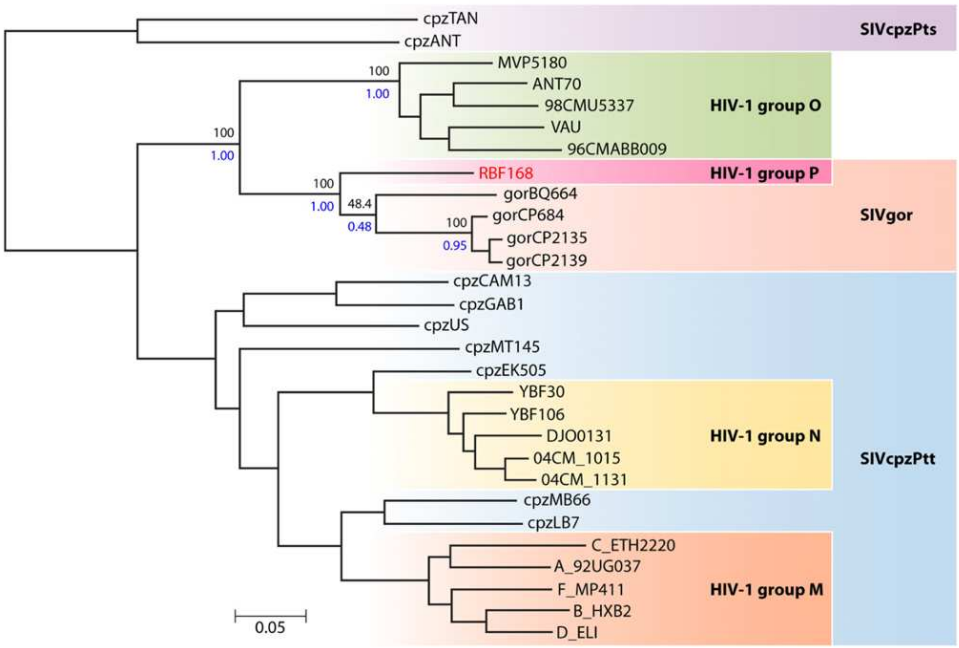


Figure 2 : Évolution des relations phylogénétiques entre les lignées du VIH-1, du SIVcpz et du SIVgor. Analyse des relations phylogénétiques réalisée par la méthode « maximum likehood » avec des alignements de séquences du VIH-1, du SIVcpz et du SIVgor. Chaque branche représente une souche virale. Les valeurs de bootstrap sont en noir et les probabilités tirées de l'analyse Babésienne sont en bleu (D'après Mourez et al., 2013).

La première évidence directe d'une infection par le VIH chez l'homme a été mise en évidence rétrospectivement dans un échantillon de sérum et une biopsie d'un ganglion lymphatique datant respectivement de 1959 et 1960 à Kinshasa. Grâce à des techniques d'horloge moléculaire, ces échantillons ont permis de dater les origines de l'épidémie du VIH chez les hommes mais également de déterminer l'ancêtre commun le plus récent de chaque lignée du VIH (Korber, 2000). Ainsi, le groupe M semble être la lignée la plus vieille chez les humains, avec un ancêtre commun estimé en 1908 (1884-1924), le groupe O est estimé dans les années 1920 (1890-1940), de façon similaire au groupe M, mais avec une croissance plus lente, qui expliquerait en partie la dissémination moindre du groupe O (Mourez et al., 2013). Enfin celle du groupe N est estimée en 1963 (1948-1977) et celle du groupe P est pour le moment inconnue, car trop peu de séquences sont disponibles.

L'étude du VIH-1-M a permis de retracer l'évolution de la pandémie mondiale après le passage chez l'homme. Le virus se serait disséminé jusqu'à Kinshasa en République Démocratique aux alentours des années 1920, suivi d'une expansion en Afrique centrale grâce aux réseaux de transport (Faria et al., 2014). Le virus a ensuite migré jusqu'à Haïti aux alentours de 1966, où il s'est répandu en quelques années (Gilbert et al., 2007). Le VIH-1 aurait émergé aux États-Unis à New-York vers 1969 puis se serait propagé dans les autres pays et autres continents par plusieurs évènements indépendants, comme en Angleterre dans les années 1980 (Hue et al., 2005).

4. Contexte épidémiologique actuel

Dans le dernier rapport épidémiologique de 2020, l'OMS estimait que 38 millions (M) de personnes vivaient avec le VIH dans le monde à la fin de 2019, dont 1,7 M de personnes nouvellement infectées par an. Cette même année, on recensait 690 000 personnes décédées de maladies liées au SIDA. Depuis 2010, on estime que les nouvelles infections à VIH ont diminué de 16% et les décès de 33%. L'Afrique de l'Est et du Sud reste la région la plus touchée par la pandémie, avec 25,7 millions de personnes vivants avec le VIH recensées en 2020. En France, le nombre de nouvelles contaminations par le VIH était de 6200 en 2018. Ce chiffre n'a pas pu encore être estimé pour l'année 2019, à cause d'une déclaration plus faible des nouveaux cas qu'habituellement, qui s'explique par la mobilisation du corps médical pour l'épidémie de SARS-Cov-2 début 2020. On estime tout de même que 6,169 millions de sérologies VIH ont été réalisées en 2019, soit une augmentation de 6% par rapport à 2018.

La majeure partie des nouvelles infections concerne les populations clés qui sont, selon la définition donnée par l'OMS, les personnes exposées à un risque accru de VIH dans tous les pays et toutes les régions. Il s'agit notamment les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH), les

usagers de drogues injectables (UDI), les travailleurs du sexe (TS) et les personnes transgenres. Cibler ces populations est donc un enjeu majeur pour ralentir la pandémie de VIH/SIDA.

Les avancées considérables réalisées en sciences, les engagements politiques, les progrès au niveau des droits de l'homme, la solidarité mondiale et les ressources disponibles ont permis de diminuer l'impact mondial de la pandémie de VIH/SIDA. Néanmoins, de nombreux efforts restent à faire dans de nombreux pays, souvent les plus marginalisés, où les ressources ne sont pas utilisées à leur pleine capacité ou de façon insuffisante. En conséquence, l'ONUSIDA a rédigé en 2014 un programme mondial de lutte qui a pour objectif d'éradiquer le VIH/SIDA à l'horizon de l'année 2030.

Deux plans d'action ont ainsi été définis. La premier est nommé 90-90-90 avait pour objectif que d'ici l'année 2020, moins de 500 000 personnes seraient nouvellement infectées par an dans le monde. Parmi ces personnes séropositives pour le VIH-1, 90% auraient été dépistées, 90% de ces personnes dépistées seraient sous traitement antirétroviral et enfin, 90% des personnes traitées auraient une charge virale indétectable. On estimait que fin 2019, 81% des personnes vivant avec le VIH connaissaient leur statut et parmi elles, 67% avaient accès au traitement. Enfin, parmi les personnes traitées, 59% avaient une virémie contrôlée (Figure 3). La cible 90-90-90 a été atteinte par certains pays comme le Botswana, le Cambodge, le Danemark, l'Islande, Singapour, la Suède et le Royaume Uni. Pour ce qui est de l'Afrique de l'Est et l'Afrique Australe, l'Europe de l'ouest et l'Europe centrale, ainsi que l'Amérique Latine, les objectifs n'ont pas été atteints avant fin 2020. Cela peut notamment s'expliquer par le ralentissement des efforts de santé publique face au VIH mais également par l'apparition de la pandémie de Covid-19 début 2020 qui a provoqué une nette interruption des services de lutte contre le SIDA.
Le second plan d'action désormais en cours repose sur la même base, mais avec des valeurs élevées à 95% d'ici 2030. Pour atteindre cet objectif, il est donc important de poursuivre les mesures entreprises telles que la sensibilisation, la prévention notamment le dépistage ainsi qu'un accès mondial facilité aux traitements, notamment dans les régions les plus affectées.

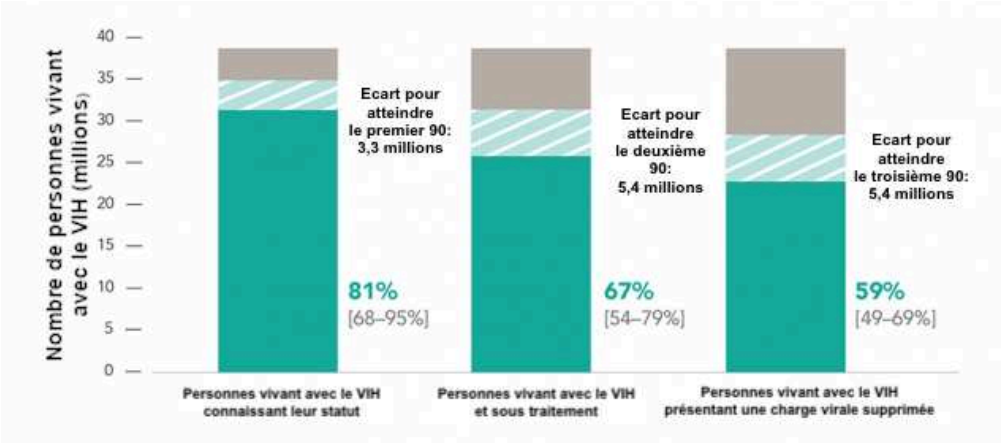


Figure 3 : Résultats de l'objectif 90-90-90 en 2020.
Histogramme représentant le pourcentage de personnes infectées, celles connaissant leur statut, celles sous traitement et celles ayant une charge virale indétectable (partie verte unie). Le nombre de personnes à dépister, à traiter et dont la charge virale doit devenir indétectable afin d'atteindre l'objectif 90-90-90 est représenté en vert hachuré. (Source : UNAIDS Special Analysis 2020)

5. Transmission et physiopathologie du VIH-1

Le VIH-1 se transmet par l'échange de fluides corporels avec une personne infectée, tels que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel. La voie de transmission majeure est la voie sexuelle lors de rapports non-protégés (dans 80% des cas). Le virus peut également être transmis par voie parentérale et de la mère à l'enfant, pendant la grossesse ou lors de l'accouchement (Shaw and Hunter, 2012).

L'infection démarre par la transmission du VIH à travers la barrière mucosale, de façon libre, sous forme de cellule infectée ou encore par liaison aux cellules dendritiques ou aux cellules de Langerhans. Les premières cellules infectées au niveau des muqueuses génitales sont les lymphocytes T (LT) CD4+ partiellement activés, moins d'une semaine après l'exposition au virus. Le virus se propage ensuite localement dans les LT CD4+ activés puis migre rapidement au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT), où il induit une déplétion massive des LT CD4+ mémoires de la lamina propria (Moir et al., 2011). La capacité du VIH à établir une infection productive est liée à la présence et à la disponibilité de LT CD4+ cibles exprimant le corécepteur CCR5. Plusieurs études montrent également que la transmission du VIH est facilitée lors d'une inflammation du tractus génital, d'une modification de la flore bactérienne ou encore lors de la présence d'ulcères génitaux découlant de maladies sexuellement transmissibles.

L'évolution de l'infection se caractérise par trois phases cliniques majeures : la phase aigüe, la phase chronique d'infection et le stade SIDA qui est la phase finale de l'infection par le VIH (Figure 4).

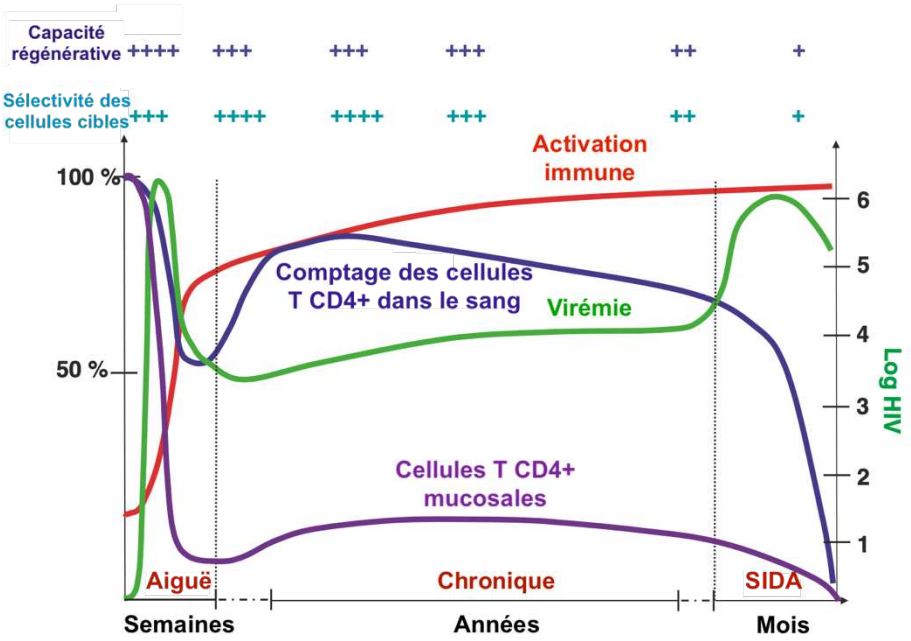


Figure 4 : Progression de l'infection naturelle par le VIH-1.
Sans traitement antirétroviral, l'évolution de l'infection par le VIH-1 se caractérise par trois phases caractérisées par l'évolution au cours du temps de la charge virale (courbe verte) et du taux de lymphocytes T CD4+ dans le sang (courbe bleue) ou dans les muqueuses (courbe violette). La phase aiguë dure quelques semaines, la phase chronique jusqu'à plusieurs années et la phase SIDA quelques mois. Une activation stable du système immunitaire est observée dès la primo-infection et jusqu'au dernier stade (courbe rouge) (D'après Grossman et al., 2006).

7.1. La phase aiguë

La phase aiguë débute après l'établissement de l'infection et dure entre trois et douze semaines. Cette phase est caractérisée par des symptômes cliniques ressemblant à un syndrome pseudo-grippal associé à une virémie plasmatique élevée et de la fièvre. Une grande variabilité des symptômes et de leur gravité est observée selon les patients. Le virus reste généralement indétectable pendant les dix premiers jours suivant l'infection, lors de la « phase d'éclipse », pendant laquelle la multiplication virale reste cantonnée aux LT CD4+, aux macrophages et aux cellules dendritiques de la muqueuse du site de transmission, des sous-muqueuses ou des vaisseaux sanguins environnants (Shaw and Hunter, 2012). La primo-infection se caractérise ensuite par une réplication virale active atteignant un pic entre trois et quatre semaines après l'exposition au virus accompagné par une diminution progressive et transitoire du taux de LT CD4+ dans le sang périphérique et une déplétion massive du nombre de LT CD4+ mémoires (Figure 4). Le virus se dissémine ensuite rapidement dans les tissus lymphoïdes secondaires, la rate, les ganglions lymphatiques et le tissu lymphoïde secondaire associé aux muqueuses intestinales (GALT) où il s'y réplique intensément et établit des réservoirs viraux persistants (Li et al., 2005; Moir et al., 2011). La primo-infection se caractérise sur le plan immunologique par une diminution importante et rapide des populations de LT CD4+ présents dans

le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette diminution est palliée par la mise en route des réponses immunitaires humorales et cellulaires induisant la production d'anticorps anti-VIH et de LT CD8+ provoquant une chute de la virémie et une augmentation des LT CD4+ périphériques (Cohen et al., 2011). La phase aiguë se termine suite à une légère remontée du taux de LT CD4+ et une diminution variable de la virémie selon les individus.

Une classification des différents stades de l'infection aiguë a été proposée en 2003 suivant l'apparition des marqueurs virologiques chez une personne contaminée et est un outil majeur lors du diagnostic de l'infection (Fiebig et al., 2003). Elle est basée sur la détection de l'ARN viral (par RT-qPCR), de l'antigène p24 (par ELISA) et des anticorps anti-VIH (par ELISA et/ou Western Blot) (Figure 5).

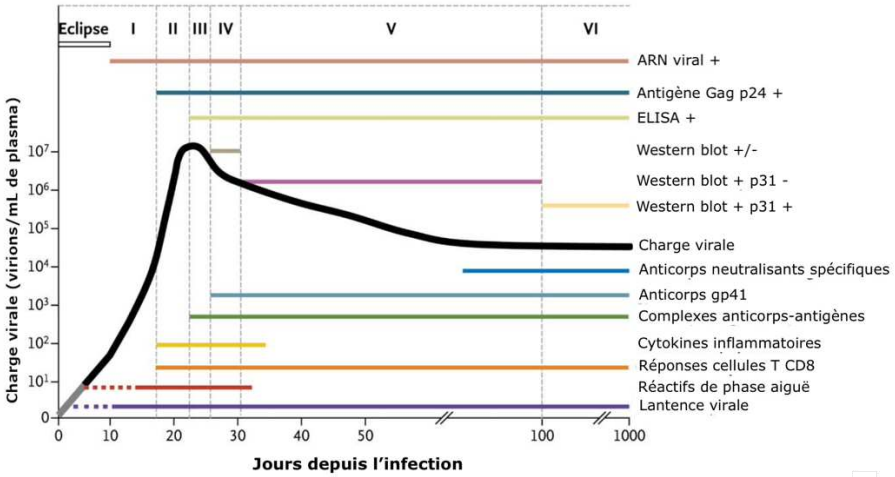


Figure 5 : Cinétique de la phase aiguë l'infection par le VIH-1 et classement des différents stades selon Fiebig.
La progression de l'infection par le VIH-1 lors de la phase aiguë de l'infection peut être divisée en six phases successives définies par l'apparition séquentielle des différents marqueurs biologiques résultant de tests cliniques standards de laboratoire. La phase d'éclipse est caractérisée par l'augmentation progressive de la charge virale (courbe noire). La première phase démarre avec l'apparition de l'ARN viral (en marron). La deuxième phase est caractérisée par l'apparition de l'antigène p24 (en bleu marine), des cytokines inflammatoires (en jaune) et de la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8 (en orange). Les phases suivantes correspondent à la détection des différents marqueurs viraux et immunitaires par différentes techniques biochimiques. (D'après Cohen et al., 2011)

7.2. La phase chronique

La phase chronique de l'infection débute lorsque la réplication virale se stabilise. Sa durée est variable selon les individus infectés. Elle dure moins de trois ans chez les « progresseurs rapides » (5% des individus), sept à dix ans pour les « progresseurs typiques » (90% des individus) jusqu'à plus de dix ans pour les « progresseurs lents ». Une catégorie spéciale de patients, les « elite controllers », sont capables de contrôler efficacement et durablement l'infection sans aucun traitement en réduisant leur

charge virale à un niveau indétectable grâce à une réponse immunitaire cellulaire plus efficace (Lambotte et al., 2005). Cette période est asymptomatique et se caractérise par une charge virale plutôt stable même chez les patients non-traités et par l'établissement de réservoirs viraux dans LT des tissus périphériques, où le virus est présent dans le génome cellulaire sous forme latente. Ces réservoirs contiennent une concentration importante de cellules immunitaires, favorisant les contacts étroits entre elles et assurant ainsi une propagation silencieuse du virus. Cette phase clinique se caractérise par une lymphaénopathie persistante où le taux de LT CD4+ diminue au cours des années jusqu'à atteindre des taux critiques inférieurs à 350-500/mm^3 dans le sang.

7.3. Le SIDA

La troisième et dernière phase est le Syndrome d'Immunodéficience Acquise ou SIDA caractérisé par un affaiblissement des défenses immunitaires du patient infecté. Cette phase débute quand le taux de lymphocytes T CD4+ du sang chute en dessous de 200 LT CD4+/mm^3. La perte de l'immunité cellulaire et l'augmentation massive de la réplication et de la charge virale rend les individus infectés « immunodéprimés » et plus susceptibles de contracter des complications tumorales et/ou des infections opportunistes d'origine fongique, bactérienne, virale ou parasitaire (Grossman et al., 2006). Le décès du patient se produit en moyenne dans les neuf mois qui suivent le début du stade SIDA.

6. Prévention et contrôle de l'infection par le VIH

6.1. Prévention

Plusieurs méthodes de prévention de l'infection par le VIH-1 sont aujourd'hui disponibles. L'utilisation du préservatif est un rempart majeur de protection contre le VIH/SIDA mais également contre d'autres MST et IST. Le diagnostic précoce de l'infection grâce au dépistage permet également d'éviter les complications sévères de la maladie. Il permet de détecter la présence d'anticorps anti-VIH dans le sang. Plus récemment, l'introduction d'un nouveau traitement prophylactique pour les personnes séronégatives s'est révélé très efficace pour empêcher les nouvelles infections par le VIH-1. Il s'agit de la PrEP et est une association de deux antirétroviraux.

6.2. Traitements antirétroviraux et recherche vaccinale

La thérapie antirétrovirale (cART) est un traitement comprenant généralement une combinaison de trois médicaments antirétroviraux ou plus qui vont inhiber la réplication virale par différents mécanismes (Eggleton and Nagalli, 2021). La trithérapie antirétrovirale est indiquée pour le traitement du VIH-1 depuis 1996. Ce traitement permet de réduire la charge virale d'un patient à un niveau indétectable (moins de 50 copies d'ARN/mL de sang) et de ce fait d'empêcher la transmission à

d'autres personnes, de réduire la mortalité ainsi que d'améliorer la fonction immunitaire. Malheureusement, cette trithérapie antirétrovirale ne permet pas de totalement supprimer le réservoir viral, obligeant une prise du traitement par le patient à vie.

Il existe six classes principales d'agents antirétroviraux (ARV) ciblant différentes étapes du cycle de réplication viral (Arts and Hazuda, 2012).

- Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcription inverse (NRTIs et NtRTIs) : ce sont des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques modifiés qui sont incorporés dans le brin d'ADN viral néoformé. Ils se fixent à la transcriptase inverse et induisent un arrêt prématuré de la terminaison de la chaine ADN. C'est la première classe d'ARV découverte historiquement, avec notamment l'AZT, la première molécule anti-VIH-1 mise sur le marché en 1987. On retrouve également des molécules comme le Ténofovir, la Lamivudine, l'Abacavir ou encore l'Emtrivitabine.
- Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcription inverse (NNRTIs) : ils se fixent au niveau d'un site hydrophobe proche du site actif de la transcriptase inverse et causent des changements de conformation de celle-ci, induisant une inhibition de la fixation des nucléosides et de son activité polymérase. On y retrouve par exemple l'Efavirenz.
- Les inhibiteurs de la protéase (PIs) : ils inhibent de façon compétitive le clivage protéolytique des polyprotéines Gag/Pol dans les cellules infectées par la protéase, formant ainsi des virions immatures et non-infectieux. L'Atazanavir est un exemple d'inhibiteur de la protéase.
- Les inhibiteurs de l'intégrase (INIs) : ils se fixent à l'intégrase virale et empêchent l'intégration de l'ADN rétrovirale dans le génome de la cellule infectée. Cette classe comprend deux molécules : le Dolutégravir et le Raltégravir.
- Les inhibiteurs de fusion (FIs) : ils se lient à la glycoprotéine d'enveloppe gp41 et empêchent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule infectée. On y retrouve uniquement l'Enfuvirtide.
- Les inhibiteurs d'entrée ou agonistes du CCR5 : ils bloquent de façon sélective et réversible l'entrée virale dans les lymphocytes T CD4+ en empêchant la liaison entre le corécepteur CCR5 et la sous-unité gp120 de la glycoprotéine d'enveloppe. Le Maraviroc est la seule molécule de cette classe.

Les recommandations de traitement comprennent l'association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcription inverse (généralement Tenofovir/Emtricitabine) avec un inhibiteur non-nucléosidique de la transcription inverse ou un inhibiteur de l'intégrase. En cas de résistances ou d'interactions

médicamenteuses, des classes d'inhibiteurs alternatifs ou d'autres médicaments de la même classe peuvent être proposés. En juin 2020, 26 millions de personnes étaient sous traitement antirétroviral. L'avènement des ARV a permis de diminuer d'un tiers le nombre de décès liés au SIDA au cours des quinze dernières années au niveau mondial. Dans les pays développés, l'utilisation de ces traitements a permis d'améliorer considérablement les conditions de vie des patients et de diminuer les risques de contamination. Malgré cela, le VIH est un virus versatile, qui a développé de nombreux mécanismes de résistance aux traitements, entrainant de nombreux échecs thérapeutiques. L'émergence et la transmission de souches virales multirésistantes aux antirétroviraux utilisés actuellement en fait un réel problème de santé publique (Raymond et al., 2020). De nouvelles innovations sont explorées, telles que la recherche de nouvelles classes d'antirétroviraux, de nouvelles combinaisons thérapeutiques ou encore le développement d'anticorps monoclonaux. Toutefois, ces options n'empêchent pas l'éradication du virus et la guérison des patients infectés. Des réservoirs viraux réfractaires aux ARV subsistent sous forme latente chez les patients infectés. En revanche, de nombreux axes de recherche explorent la piste de contrôle du réservoir, ce qui permettraient un contrôle virologique en l'absence d'ARV.

Enfin, la meilleure option pour ralentir la progression mondiale du VIH/SIDA serait la mise au point d'un vaccin sûr et efficace. Jusqu'à présent, aucun des candidats vaccins développés n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché, soit par échec ou pour cause d'effet modeste. Seul l'essai clinique de phase III RV144 réalisé entre 2003 et 2009 en Thaïlande avait démontré une réduction du risque d'infection de 31% en comparaison avec le groupe placebo (Rerks-Ngarm et al., 2009). Malheureusement, l'essai vaccinal HVTN 702 qui lui a succédé de 2016 à 2019 en Afrique du Sud n'a pas montré de protection envers la transmission du VIH et a été arrêté.

7. Caractéristiques du VIH-1

7.1. Structure de la particule virale

Le VIH-1 appartient à la famille des *Retroviridae*, communément appelé rétrovirus, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus*. C'est un virus à ARN de polarité positive de 80 à 120 nm de diamètre (Figure 4). Il est enveloppé d'une bicouche de phospholipides provenant de la cellule hôte infectée, où sont enchâssées huit à dix trimères de glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Checkley et al., 2011; Ono and Freed, 2001; Zhu et al., 2003). La matrice virale est retrouvée directement sous le feuillet internet de la membrane virale et est composée d'environ 2000 copies de la protéine p17 (MA). Elle contient la protéase virale p11 (PR) responsable de la maturation virale ainsi que la capside virale de forme conique qui est formée d'environ 1500 copies de protéine de

capside p24 (CA) (Mateu, 2009). La capside renferme et protège les deux copies d'ARN génomique viral (ARNg), qui forment avec la nucléocapside (NC) composée des protéines p7 et p9 un complexe ribonucléoprotéique. La capside renferme également les protéines auxiliaires (Vpr, Vif, Nef) et enzymes virales nécessaires à la réplication et à l'intégration du génome : la transcriptase inverse formée de p66/51 (RT) et l'intégrase p32 (IN) (Figure 6).

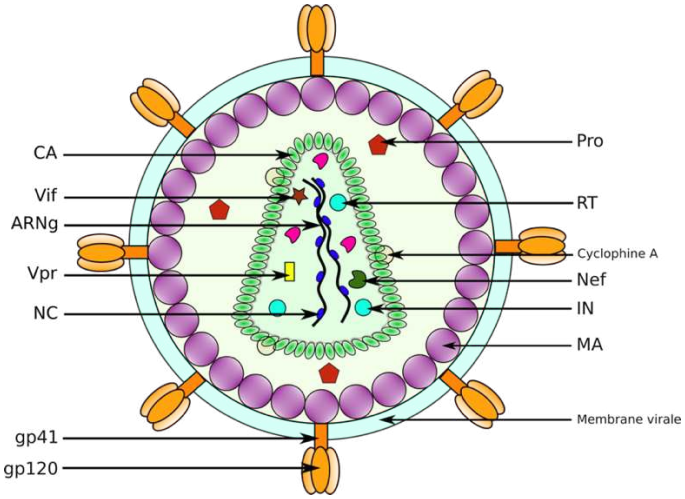


Figure 6 : Représentation schématique d'une particule virale mature du VIH-1.
Le VIH-1 est composé de deux ARN génomiques viraux (ARNg) liés non-covalemment entre eux. Ils sont entourés des protéines de nucléocapside (NCp7). La capside (CA) protège le génome viral et adopte une forme caractéristique conique. Elle est entourée par la matrice (MA), elle-même enveloppée d'une bicouche phospholipidique où sont enchâssés les glycoprotéines d'enveloppe (gp 120 et gp41). Le virus contient également les enzymes virales (RT, IN, PR) ainsi que les protéines auxiliaires (Vpr, Vif, Nef).

7.2. Organisation génétique

7.2.1. Le génome viral

Le génome du VIH-1 est composé de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,8 kb et liées de façon non-covalente au niveau de la région 5' non-traduite (Damgaard et al., 2004). Mon sujet de thèse traitant de l'interaction entre la protéine Gag et l'ARNg, la structure de l'ARNg sera détaillée dans le chapitre 2. L'ARNg est transformé en ADN double brin lors de l'étape de rétro-transcription puis intégré dans le génome de la cellule hôte. L'ADN viral est encadré par deux séquences terminales répétées et non codantes, les LTR pour Long Terminal Repeat (Figure 7). Le 5'-LTR contient le promoteur viral nécessaire à l'initiation de la transcription mais également les régions impliquées dans la régulation de la transcription de l'ADN viral. Le 3'-LTR composé des signaux de polyadénylation et de terminaison de la transcription (Ono and Freed, 2001; Peterlin and Trono, 2003). Le reste du génome viral présent entre les deux LTR est composé de neuf cadres ouverts de lecture partiellement chevauchants (ORFs : Open Reading Frames) codant pour les polyprotéines Gag. Gag-

Pol et Env, exprimées constitutivement par tous les rétrovirus, les protéines régulatrices Tat et Rev ainsi que les protéines auxiliaires Nef, Vif, Vpr et Vpu (Frankel and Young, 1998).

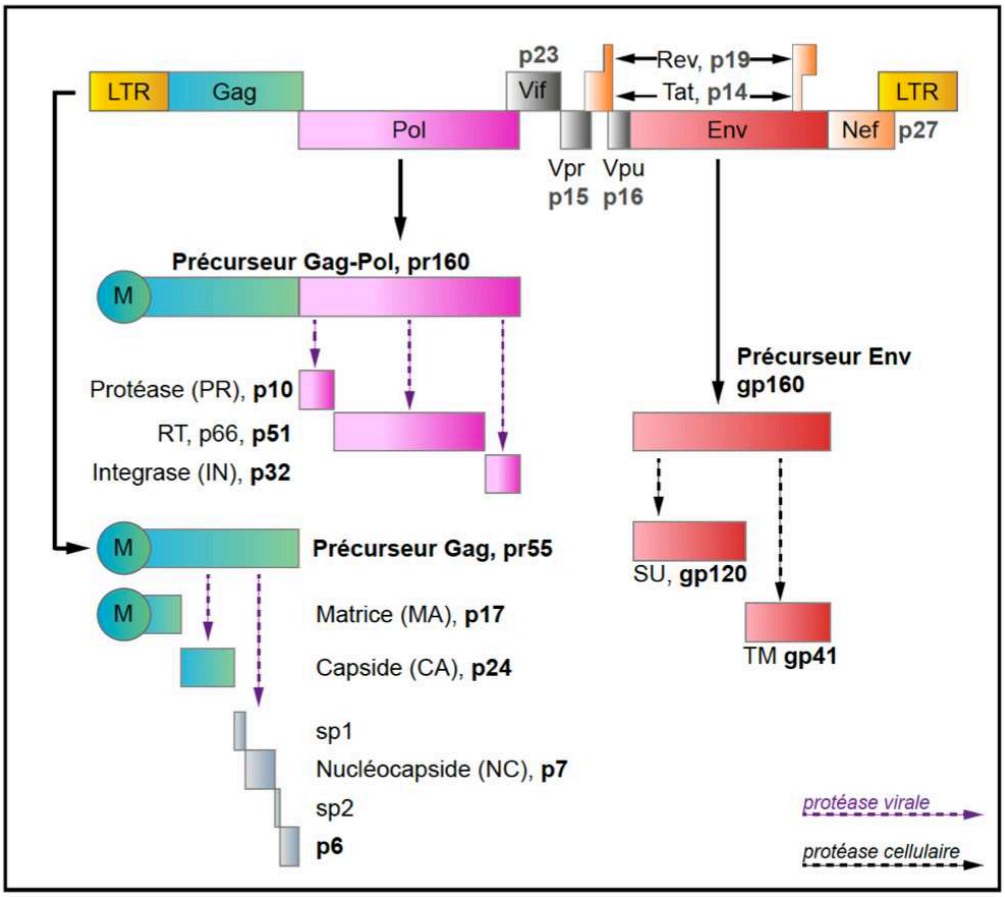


Figure 7 : Organisation génomique et protéines du VIH-1.
Le génome viral intégré dans le génome cellulaire est encadré par les deux LTR et comporte les gènes principaux *gag*, *pol* et *env* ainsi que les deux gènes de régulation *tat* et *rev* et les quatre gènes auxiliaires *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*. Ces gènes permettent la synthèse de trois précurseurs ($Pr160^{Gag\text{-}Pol}$, $Pr55^{Gag}$ et gp160-Env) représentés par les flèches pleines qui donneront après maturation 15 protéines virales. Les précurseurs Gag et Gag-Pol sont clivés par la protéase virale (flèches violettes en pointillés) tandis que le précurseur gp160 est clivé par une protéase cellulaire (Adapté de Peterlin and Trono, 2003).

7.2.2. Les protéines de structure

Le gène *gag* du VIH-1 permet d'exprimer la polyprotéine $Pr55^{Gag}$ (Gag) de 55 kDa. Gag est composée de plusieurs domaines : la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), la p6, ainsi que deux courts peptides Sp1 et Sp2. Cette protéine possède la capacité de s'auto-assembler pour former des VLPs de 100 à 120 nm à la membrane plasmique (MP) de la cellule (Gheysen et al., 1989). Gag est la protéine centrale qui orchestre l'assemblage du VIH-1 lors du cycle de réplication viral. Après l'étape de bourgeonnement et la formation de virions, la polyprotéine Gag est clivée par la protéase virale (PR) pour libérer les protéines individuelles citées ci-dessus (Bell and Lever, 2013) (Figure 7). Mon

sujet de thèse traitant de l'interaction entre la protéine Gag et l'ARNg, la structure et les différentes fonctions de la protéine Gag seront détaillées dans le chapitre 2.

Le gène *env* du VIH-1 permet la formation du précurseur Env gp160 de 160 kDa dans le RE. Lors de son trafic à la surface cellulaire, celui-ci est clivé par la furine, une protéase cellulaire, en deux protéines d'enveloppes liées non-covalemment : la protéine de surface SU (gp 120) et la protéine transmembranaire TM (gp 41) (Checkley et al., 2011; Murphy and Saad, 2020) (Figure 5). Ces deux protéines formeront des trimères d'hétérodimères présents à la surface du virion, SU est composée de 515 aa et assure la liaison au récepteur CD4 lors de l'entrée du VIH-1. Elle possède cinq régions conservées (C1 à C5) et cinq domaines hautement variables (V1 à V5). La boucle V3 possède un rôle majeur dans le choix du corécepteur (CCR5 ou CXCR4) et influence ainsi le tropisme viral, TM est formée de 345 aa et est insérée dans la membrane virale. Elle permet la fusion des membranes virales et cellulaires après la liaison de gp120 au récepteur (Ono and Freed, 2001).

7.2.3. Les enzymes virales

Le gène *pol* permet la production de la polyprotéine $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ de 160 kDa (Briggs and Kräusslich, 2011). Après clivage par la protéase, cette polyprotéine génère les trois enzymes virales nécessaires à la réplication virale et présentes dans la capside virale. La protéase (PR) de 15 kDa est active sous forme dimérique et assure le clivage des polyprotéines virales permettant la création de virions matures et infectieux (Frankel and Young, 1998). La transcriptase inverse (RT) est un hétérodimère formé des domaines p66 de 560 aa et p51 de 440 aa. Chaque domaine contient une région polymérase, p51 possède en plus un domaine RNaseH. Cette enzyme assure la transformation de l'ARNg en ADN double-brin (Hu and Hughes, 2012). Enfin, l'intégrase (IN) est formée de 288 aa divisés en trois domaines distincts. Elle est active en tant qu'oligomère et catalyse les réactions nécessaires à l'inclusion de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (Delelis et al., 2008).

7.2.4. Les protéines régulatrices

Le VIH-1 code pour deux protéines régulatrices assurant des fonctions clés au niveau de plusieurs étapes du cycle viral : Tat et Rev (Malim and Emerman, 2008).

Tat (*Transactivator of transcription*) est une protéine de 86 aa permettant d'augmenter l'efficacité de transcription de l'ARN polymérase de type II en stimulant l'élongation (Dayton et al., 1986). Elle augmente de 100 fois le taux de production des ARN messagers viraux, Tat se fixe sur la séquence TAR (*Trans-activating response element*) présente en amont du site d'initiation de la transcription dans la région 5'LTR du génome viral (Rosen et al., 1985).

Rev (*Regulator of viral gene expression*) est une protéine de 116 aa agissant au niveau post-transcriptionnel et permettant l'export dans le cytoplasme des transcrits viraux non-épissés ou partiellement épissés. Elle se fixe avec le complexe cellulaire CRMI-Ran-GTP à la séquence RRE (*Rev Response Element*) localisée au niveau du gène *env* (Karn and Stoltzfus, 2012).

7.2.5. Les protéines auxiliaires

Pour terminer, le VIH-1 possède quatre protéines dites auxiliaires : Nef, Vif, Vpr et Vpu qui sont dédiées à l'évasion du système immunitaire et à sa manipulation par le virus (Malim and Emerman, 2008).

Nef (Negative Factor) est une protéine cytoplasmique de 27 kDa qui est associée à la MP. Elle n'est pas nécessaire à la réplication virale *in vitro* mais qui est indispensable à la pathogénicité virale *in vivo*. C'est une des premières protéines virales exprimée dans la cinétique d'infection. Nef se lie à la queue cytoplasmique du récepteur CD4 à la surface des lymphocytes T CD4 et induit son endocytose par une voie dépendante de la clathrine, ce qui conduit ainsi sa dégradation par les lysosomes (Aiken et al., 1994). Nef régule également l'expression du TCR des lymphocytes T et diminue l'expression du CMH-I (Abraham and Fackler, 2012). Enfin, Nef empêche l'incorporation des protéines SERINC3 et SERINC5 dans les virions, augmentant ainsi leur infectiosité (Usami et al., 2015).

Vif (Viral infectivity factor) est une protéine cytoplasmique de 192 acides aminés qui est essentielle à la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T lors de l'infection *in vivo* (Malim and Emerman, 2008). On retrouve entre 7 et 100 molécules de Vif par virion. Vif inhibe l'effet antiviral de la protéine APOBEC3G en recrutant un complexe ubiquitine ligase qui induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. En l'absence de Vif, APOBEC3G est encapsidé dans les virions par liaison à l'ARNg et à Gag puis induit des mutations polynucléotidiques en désaminant les cytosines en uraciles (Salter et al., 2014).

Vpr (*Viral protein R*) est une protéine de 96 aa encapsidée dans les virions. Elle a pour effet d'arrêter les cellules infectées en phase G2 du cycle cellulaire, ce qui permet la localisation nucléaire du VIH-1 dans les cellules ne se divisant pas (par exemple les macrophages) et facilite ainsi leur infection. En effet, elle possède un NLS qui permet d'acheminer les complexes nucléoprotéiques dans le noyau, même en absence de mitose cellulaire dégradant l'enveloppe nucléaire. Vpr est encapsidée dans les virions grâce à une interaction avec p6. Elle engage également un complexe ubiquitine ligase (Guenzel et al., 2014; Zhao and Bukrinsky, 2014).

Vpu (*Viral protein U*) est une protéine dimérique de 81 aa (Malim and Emerman, 2008). Elle assure en premier lieu la diminution de l'expression du récepteur CD4 en recrutant le complexe ubiquitine ligase-culline-Skp1 au niveau de sa queue cytoplasmique et induit sa dégradation, empêchant la formation des complexes CD4/gp160 dans le RE (Frankel and Young, 1998; Tokarev and Guatelli, 2011). Dans un second temps, Vpu agit également sur la thétérine, un facteur de restriction induit par l'interféron, qui retient le virus à la MP et empêche son détachement, voir même induit son internalisation dans les endosomes. Enfin, Vpu diminue l'expression des protéines du CMH-I en surface des cellules infectées (González, 2015).

8. Cycle de réplication du VIH-1

Le VIH-1 infecte des cellules non-prolifératives (Yamashita and Emerman, 2005), notamment les lymphocytes T CD4+ et les macrophages (Stevenson, 2003). Le cycle de multiplication du VIH-1 au sein de la cellule infectée est orchestré en plusieurs étapes aboutissant à la formation de virions matures et infectieux en approximativement 48 heures (Holmes et al., 2015). Les étapes précoces comprennent l'attachement et l'entrée dans la cellule cible puis la transcription inverse du génome et son intégration dans l'ADN de la cellule hôte (Figure 8). Les étapes tardives débutent par la transcription des gènes viraux, la traduction des protéines virales, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation (Figure 12).

8.1. Étapes précoces

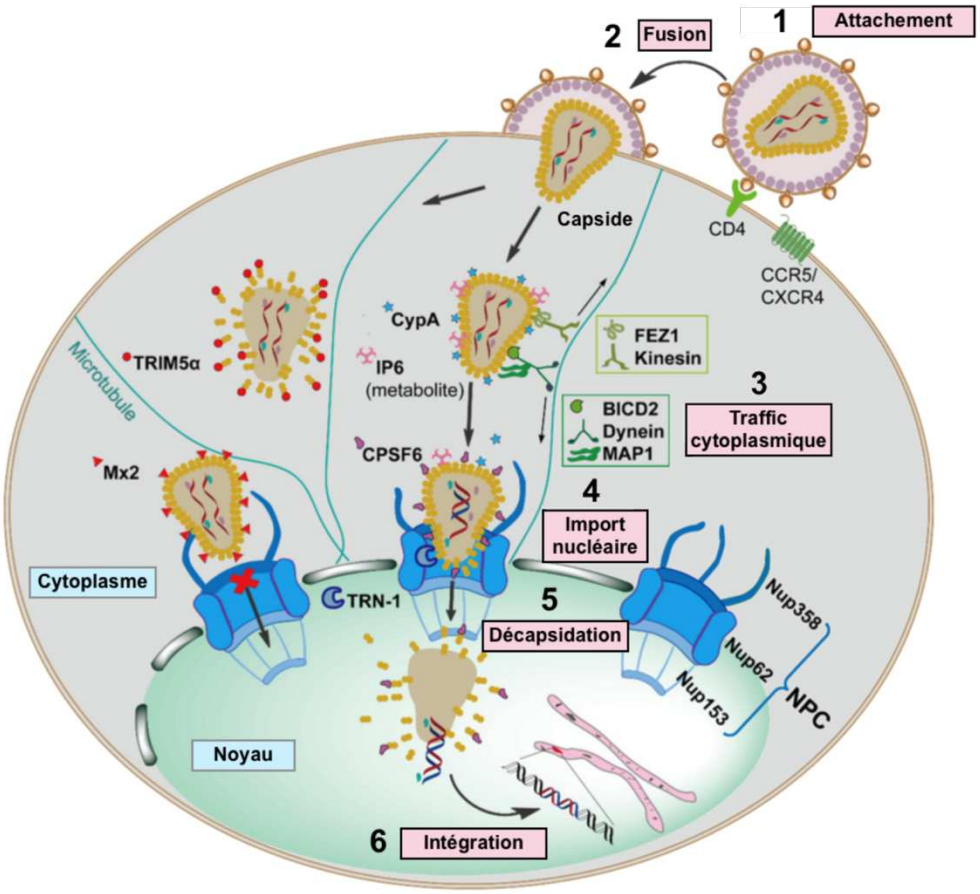


Figure 8 : Étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1.
L'infection de la cellule cible (lymphocyte T CD4 ou macrophage) est initiée par la liaison des glycoprotéines d'enveloppe (Env) avec le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (1). L'attachement est suivi de la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire ce qui permet la libération de la capside virale dans la cellule hôte (2). La capside est acheminée vers le noyau grâce au réseau de microtubules avec la participation de nombreuses protéines cellulaires (3), puis elle traverse entièrement le pore nucléaire (NPC) en association avec le facteur cellulaire CPF6 (4). Une fois dans le noyau, elle est décapsidée et libère le génome ADN rétro-transcrit (5). Enfin, le provirus est intégré dans le génome de la cellule hôte (6). De nombreux facteurs de restriction altèrent ces étapes, tels que TRIM5α ou Mx2. (Adapté de Zhuang and Torbett, 2021).

8.1.1. Attachement aux cellules cibles, entrée et tropisme viral

Pour démarrer son cycle de réplication dans une cellule, le VIH-1 doit initier un processus d'entrée dans la cellule cible. Il s'attache tout d'abord à la surface de la cellule de façon non-spécifique par liaison avec les héparanes sulfates protéoglycanes (Wilen et al., 2012) et d'autres molécules comme l'intégrine α4β7, (Arthos et al., 2008) et la lectine DC-SIGN présente en surface des cellules dendritiques. Puis la protéine d'enveloppe gp120 interagit avec le récepteur CD4 présent à la surface de des lymphocytes T CD4, des macrophages, des monocytes ou des cellules dendritiques (Dalgleish et al., 1984; Kwong et al., 1998). Le récepteur CD4 appartient à la superfamille des immunoglobulines et joue un rôle important dans la reconnaissance immunitaire et l'activation des lymphocytes. Cette

liaison CD4/gp120 entraine un changement conformationnel dans la gp120, rapproche plusieurs de ses domaines, notamment la boucle V3, et crée ainsi un site de liaison pour les corécepteurs des chimiokines (Rizzuto, 1998; Wu et al., 1996). Le VIH-1 peut se lier aux molécules CCR5 et/ou CXCR4, ce qui détermine le tropisme des isolats viraux (Clapham and Weiss, 1997). On distingue les virus dits « R5 » qui infectent généralement les macrophages et les virus « X4 » qui infectent principalement les lymphocytes T primaires et les lignées lymphocytaires (Alkhatib et al., 1996; Y. Feng et al., 1996; Oberlin et al., 1996). Les virus « R5X4 » possèdent le double tropisme viral. Suite à la liaison aux corécepteurs, un second changement de conformation se produit afin d'exposer le peptide de fusion de gp41 et de l'insérer dans la membrane cellulaire. Cela induit le repliement des sous-unités de gp41, le rapprochement des membranes virales et cellulaires et la formation d'un faisceau à six hélices qui induit la formation d'un pore de fusion, aboutissant *in fine* à la libération de la capside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte (Melikyan, 2008; Wilen et al., 2012) (Figure 9).

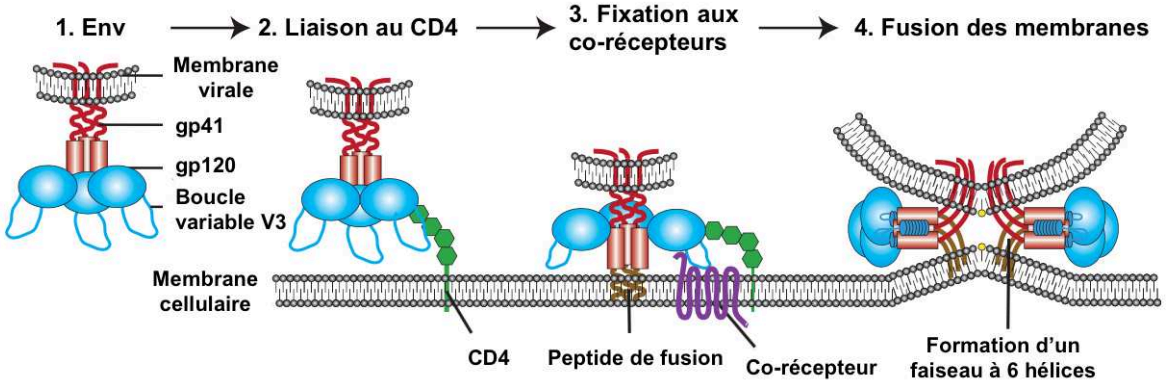


Figure 9 : Représentation schématique des étapes de l'entrée du VIH-1.
La glycoprotéine Env du VIH-1 est formée par des trimères d'hétérodimères composés de la protéine de surface gp120 et de la protéine transmembranaire gp41 ancrée dans la membrane virale (1). La gp120 se lie en premier lieu au récepteur cellulaire CD4 (2) et induit des changements conformationnels permettant la fixation aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (3). S'en suit la fusion des membranes virale et cellulaire grâce à l'ancrage du peptide de fusion de gp41 et la formation d'un faisceau à six hélices. Ce processus aboutit à la formation d'un pore de fusion (non-représenté) libérant la capside virale dans le cytoplasme (Adapté de Wilen et al., 2012).

Au cours de l'infection par le VIH-1, le tropisme viral et la nature des virus évoluent. Les virus R5 sont préférentiellement transmis lors d'un évènement de contamination, quel que soit le mode de transmission et sont majoritairement représentés chez les patients infectés (van't Wout et al., 1994; Zhu et al., 1993). Ces virus sont également prédominants pendant la phase chronique de l'infection (avec une prévalence d'environ 80 % pour le sous-type B) et dans les stades les plus avancés (environ 60% des isolats viraux) (Brumme et al., 2005; Moyle et al., 2005). Inversement, les virus R5X4 ou X4 sont rarement transmis mais leur fréquence s'accroit au cours de l'infection. Des virus à double tropisme R5X4 sont essentiellement retrouvés dans les phases plus tardives (Frange et al., 2010, 2009;

Raymond et al., 2013, 2010). Les virus X4 restent rares et sont présents chez environ 20% des patients dans la phase chronique de l'infection pour le sous-type B (Bratt et al., 1998). Les raisons expliquant la plus faible proportion de virus X4 au cours de l'infection virale restent sujettes aux hypothèses et sont paradoxales étant donné que le récepteur CXCR4 est plus largement exprimé à la surface des cellules cibles en comparaison au CCR5. La proportion plus faible de virus X4 pourrait s'expliquer par l'infection préférentielle de cellules faiblement activées où le taux de réplication est faible (LT CD4 quiescents). Inversement, les virus R5 infecteraient plus les LT CD4 mémoires activés possédant un fort taux de prolifération, ce qui entraine une production virale plus importante.

Un lien étroit entre le tropisme viral et la pathogénicité de l'infection a été proposé. En effet, l'émergence de virus X4 est plus souvent associée à un déclin accéléré du taux de lymphocytes T CD4+ et à une progression plus rapide vers le stade SIDA (Koot et al., 1993; Richman and Bozzette, 1994; Tersmette et al., 1989). Cette émergence n'est en revanche pas indispensable au développement du SIDA, ce qui explique que dans l'évolution naturelle de l'infection, la majorité des virus restent exclusivement de tropisme R5. Les virus R5 possèdent des propriétés biologiques différentes selon qu'ils soient retrouvés dans la phase chronique ou dans les phases tardives de l'infection. Par exemple, les virus R5 retrouvés tardivement sont plus cytopathogènes et se répliquent de manière plus efficace (Kwa et al., 2003; Repits et al., 2008, 2005; Scoggins et al., 2000). Les virus X4 déplètent plus massivement les LT CD4+ que les virus R5 (Koot et al., 1992; Penn et al., 1999), ce qui peut s'expliquer par existence accrue de cellules exprimant CXCR4, plus nombreuses que celles exprimant CCR5 (Fouchier and Schuitemaker, 1996; Grivel and Margolis, 1999). De plus, la pathogénicité supérieure des virus X4 peut s'expliquer d'une part par le fait qu'ils sont capables d'infecter des cellules naïves impactant le renouvellement des LT CD4+ mémoires mais également d'autre part qu'ils sont capables d'infecter les thymocytes, affectant la production des LTCD4 naïfs (Douek et al., 1998).

8.1.2. Décapsidation et transcription inverse

Une fois la capside virale libérée dans le cytoplasme cellulaire, elle doit être déstabilisée afin de libérer le génome ARN, qui lui-même doit être transformé en ADN afin d'être intégré dans les chromosomes cellulaires présents dans le noyau. Ces deux étapes sont la décapsidation (*uncoating*) et la transcription inverse et semblent étroitement corrélées et interdépendantes (Mamede et al., 2017), et sont décrites dans les paragraphes suivants.

8.1.2.1. Décapsidation et transcription inverse

La décapsidation correspond à la dissociation progressive de la capside virale, composée des monomères de capside p24 (Aiken, 2009). La localisation de cet évènement et sa temporalité sont sujettes aux controverses et plusieurs modèles ont été proposés (Arhel, 2010).

Le premier modèle qui a proposé initialement était en faveur d'une décapsidation passive ayant lieu à côté de la MP très rapidement après l'entrée virale. Ce modèle est caractérisé par une dissociation complète des molécules de la capside (Bukrinsky, 2004; Suzuki and Craigie, 2007; Dvorin and Malim, 2003 ; Grewe et al., 1990 ; Lehmann-Che and Saïb, 2004).

Le second modèle suggère que la capside reste intacte quelques temps après l'entrée virale, au moins le temps nécessaire à l'initiation de la transcription inverse, car ces deux étapes seraient étroitement liées. La décapsidation se produirait graduellement dans le cytoplasme et conjointement à la transcription inverse (Arhel, 2010; Warrilow et al., 2009) menant à la formation du complexe de transcription inverse (RTC). Une étude récente menée par imagerie en temps réel a mis en évidence une déstabilisation des protéines de capside dans les trente minutes suivant la fusion virale (Mamede et al., 2017). Le trafic de la capside est dépendant du réseau de microtubules et la décapsidation serait facilitée par la dynéine et la kinésine 1 (Lukic et al., 2014; Malikov and Naghavi, 2017). Le troisième modèle proposé est en faveur d'un transport de la capside intacte jusqu'au pore nucléaire, où elle subit une décapsidation partielle aboutissant à la libération du génome rétro-transcrit dans le noyau (Hulme et al., 2015). La décapsidation serait initiée suite à la réalisation du processus de transcription inverse. Le moment précis de l'initiation de la transcription inverse reste encore une source de questionnement. D'anciennes études suggèrent que la transcription inverse se produiraient dans le cytoplasme pendant le transport de la capside vers le noyau (Bukrinsky, 2004) tandis que de récentes expériences montrent que la transcription inverse serait réalisée dans le noyau (Burdick et al., 2020; Dharan et al., 2020).

Enfin, des études très récentes soulignent un dernier modèle où la capside virale presque intacte serait apportée au niveau de la membrane nucléaire puis transloquée au travers du pore nucléaire en moins de 5h après l'entrée virale (Burdick et al., 2020; Dharan et al., 2020). Les capsides virales entreraient dans le noyau par des interactions avec la protéine cellulaire CPSF6 (Burdick et al., 2020). Deux études de microscopie corrélative ont montré d'une part une restructuration de la capside en « collier de perle » autour de l'ADN pour permettre l'entrée de la capside dans le noyau (Blanco-Rodriguez et al., 2020) mais également une dilatation du pore nucléaire suffisante pour l'entrée nucléaire de la capside (Zila et al., 2021). Dans ce modèle, l'import nucléaire de la capside précèderait les étapes de transcription inverse et de décapsidation (Selyutina et al., 2020). Enfin, la décapsidation se produirait dans le noyau à partir d'une cassure dans la capside et non pas par désassemblage des sous-unités de

la capside (Zila et al., 2021), au niveau de locus proches des sites d'intégration du génome cellulaire (Burdick et al., 2020) et très peu de temps avant l'intégration (Li et al., 2021).

8.1.2.2. Transcription inverse

La transcription inverse est l'étape permettant la transformation de l'ARN viral simple brin positif en ADN double brin, forme qui sera intégrée dans le génome de la cellule hôte (Figure 10).

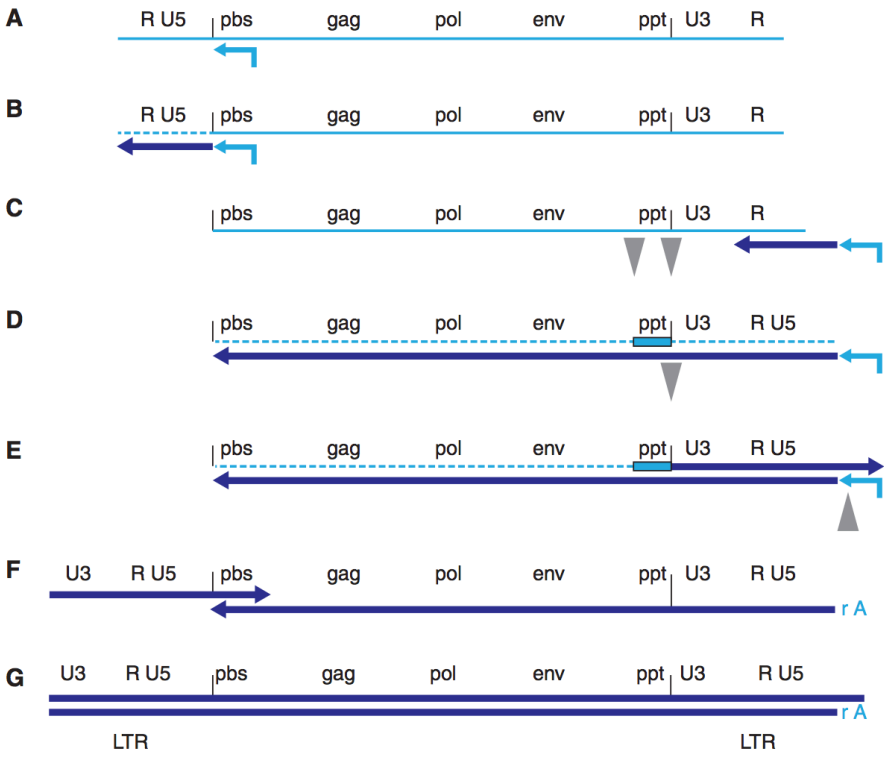


Figure 10 : Étapes détaillées de la transcription inverse du VIH-1.
La transcription inverse du VIH-1 est assurée par la transcriptase inverse virale (RT) et permet la formation d'un ADN viral double brin (ligne bleu foncé) à partir de l'ARN viral (ligne bleu clair). (A) Afin d'initier le la synthèse du brin d'ADN (-), le VIH-1 utilise comme amorce l'ARNt$_3^{Lys}$ de l'hôte (flèche bleu clair), dont l'extrémité 3'-OH va se fixer au niveau de la séquence PBS (Primer Binding Site). (B) La RT réalise tout d'abord la synthèse du brin d'ADN (-) jusqu'au début de l'extrémité 5'UTR de l'ARN viral. S'en suit directement la dégradation de la matrice d'ARN du duplex ADN/ARN grâce à l'activité RNase H de la RT (ligne en pointillés). (C) Le brin d'ADN (-) est transféré au bout de la séquence 3' UTR de l'ARN viral et continue la synthèse complémentaire des régions U5 et R. (D) La RT continue la synthèse de tout le brin d'ADN (-) sur toute la longueur du génome. (E) La RT dégrade l'ARN viral, sauf la séquence ppt riche en purines et adjacente à la région U3 qui est résistante à l'activité RNase H. Cette séquence est utilisée comme amorce pour démarrer la synthèse du brin d'ADN (+) jusqu'aux 18 premiers nucléotides de l'ARNt$_3^{Lys}$, permettant ainsi leur dégradation ainsi que celle de la séquence ppt. (F) Le second transfert de brin d'ARN (+) assure la liaison des deux régions PBS des brins d'ADN (+) et (-) permettant l'extension des deux brins d'ADN et la synthèse complète de l'ADN viral linéaire double brin (G) (D'après Hu and Hughes, 2012).

Ce mécanisme est bien décrit mais la temporalité de cette étape est encore sujette aux débats, comme évoqué plus haut. Le RTC (*Reverse Transcription Complex*) contient l'ARN viral, les enzymes virales (RT et IN), les protéines virales MA, CA, NC et Vpr ainsi que plusieurs protéines cellulaires (Warren et al., 2012). La transcriptase inverse (RT), une ADN polymérase ARN/ADN dépendante, catalyse la transformation de l'ARN viral en ADN simple brin négatif puis dégrade la matrice ARN du duplex ARN/ADN grâce à son activité RNase H (Hu and Hughes, 2012). La RT synthétise ensuite le brin d'ADN positif complémentaire, créant ainsi l'ADN bicaténaire (ADNc) qui sera lui-même associé au complexe de pré-intégration. Il a été montré que les ARN totalement épissés du VIH-1 sont soumis aussi efficacement à la transcription inverse que les ARN viraux non-épissés dans les cellules et dans les virions (Houzet et al., 2007).

La transcription inverse fait intervenir de nombreuses protéines virales, notamment la protéine virale NCp7 qui chaperonne les acides nucléiques (Darlix et al., 1995) et contrôle spatio-temporellement la synthèse d'ADN (Mougel et al., 2009). En effet, il a été montré que la délétion des deux doigts de zinc de la NC permet une activation précoce de la transcription inverse durant les étapes tardives de la réplication (Didierlaurent et al., 2008) et aboutit à la formation de virions non-infectieux contenant une quantité plus élevée d'ADN viral (Houzet et al., 2008). De plus, le contrôle de la NC sur la transcription inverse pendant les étapes tardives de l'assemblage viral fait également intervenir des interactions entre la NCp7, la séquence d'encapsidation du 5'UTR de l'ARNg (Retureau et al., 2019).

8.1.3. Intégration du génome viral

Une fois l'ADNc formé, le RTC est transformé en un complexe de pré-intégration, le PIC (*Pre-integration complex*) qui a pour rôle d'assurer l'intégration de l'ADNc *in vivo* dans le génome cellulaire (Grandgenett, 2015; Miller et al., 1997). Il est composé de l'ADNc, d'enzymes virales (RT, IN), de protéines virales (MA, CA, NC et Vpr) et de divers facteurs cellulaires tels que LEDGF, INI1 ou HMG I (Y) (Chin et al., 2015; Maillot et al., 2013; Suzuki and Craigie, 2007). Un grand nombre de ces facteurs contiennent des signaux de localisation nucléaire ou NLS (*Nuclear Localisation Signal*) leur permettant d'interagir avec la machinerie d'import nucléaire de la cellule, notamment les composants du pore nucléaires et les importines α et β (Suzuki and Craigie, 2007).

L'intégrase virale (IN) catalyse une série de trois réactions pour incorporer le génome viral dans celui de la cellule hôte (Delelis et al., 2008) (Figure 9). Tout d'abord, l'IN se lie à chaque LTR de l'ADNc linéaire et ôte deux nucléotides à l'extrémité 3'. Ensuite, les extrémités 3'-OH libres de l'ADNc sont jointes covalemment aux extrémités 5' de l'ADN cellulaire, préalablement clivé au niveau d'une

liaison phosphodiéster. Enfin, les nucléotides non-appariés en 5 ’de l’ADNc sont enlevés par les enzymes de réparation de l’ADN cellulaire et un ADN proviral est ainsi intégré dans le génome de la cellule hôte (Elliott and Kutluay, 2020; Frankel and Young, 1998) (Figure 11). L’intégration est favorisée au niveau de sites actifs de transcription, notamment les régions d’euchromatine proches du pore nucléaire, ce qui permettra une réplication virale efficace après l’intégration (Craigie and Bushman, 2012; Marini et al., 2015).

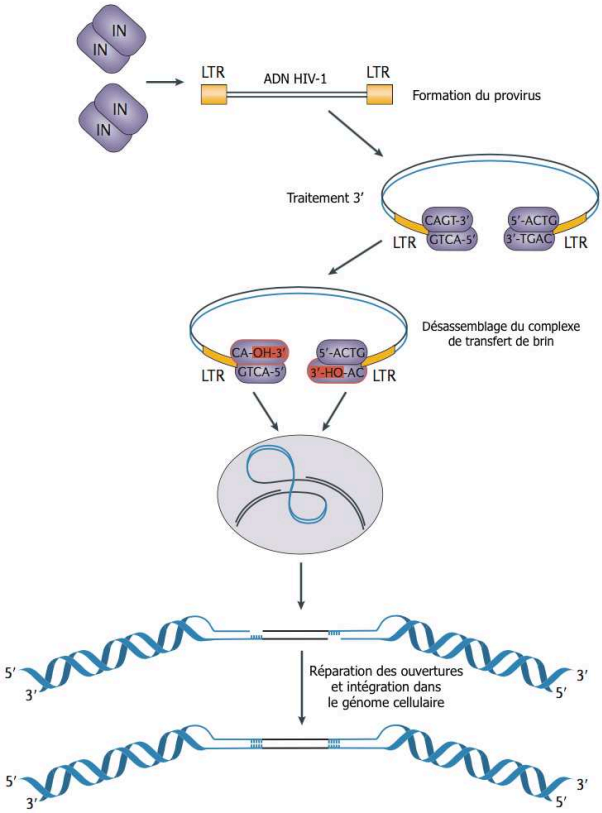


Figure 11 : Étapes détaillées de l’intégration de l’ADN du VIH-1 dans le génome cellulaire.
L’intégrase se multimérise aux extrémités des LTR viraux puis clive les deux nucléotides de chaque extrémité 3’ pendant l’étape de traitement 3’. La réalisation de cette étape laisse un groupement hydroxyle libre. Dans le noyau, l’intégrase se lie à l’ADN cellulaire cible et l’étape du transfert de brin débute. Le complexe de transfert de brin est désassemblé puis l’intermédiaire ADN recombinant est réparé, probablement par des enzymes cellulaires, Le provirus, entouré des séquences ADN de l’hôte, se retrouve intégré dans la chromatine cellulaire. (Adapté de Lusic and Siliciano, 2017).

8.2. Étapes tardives

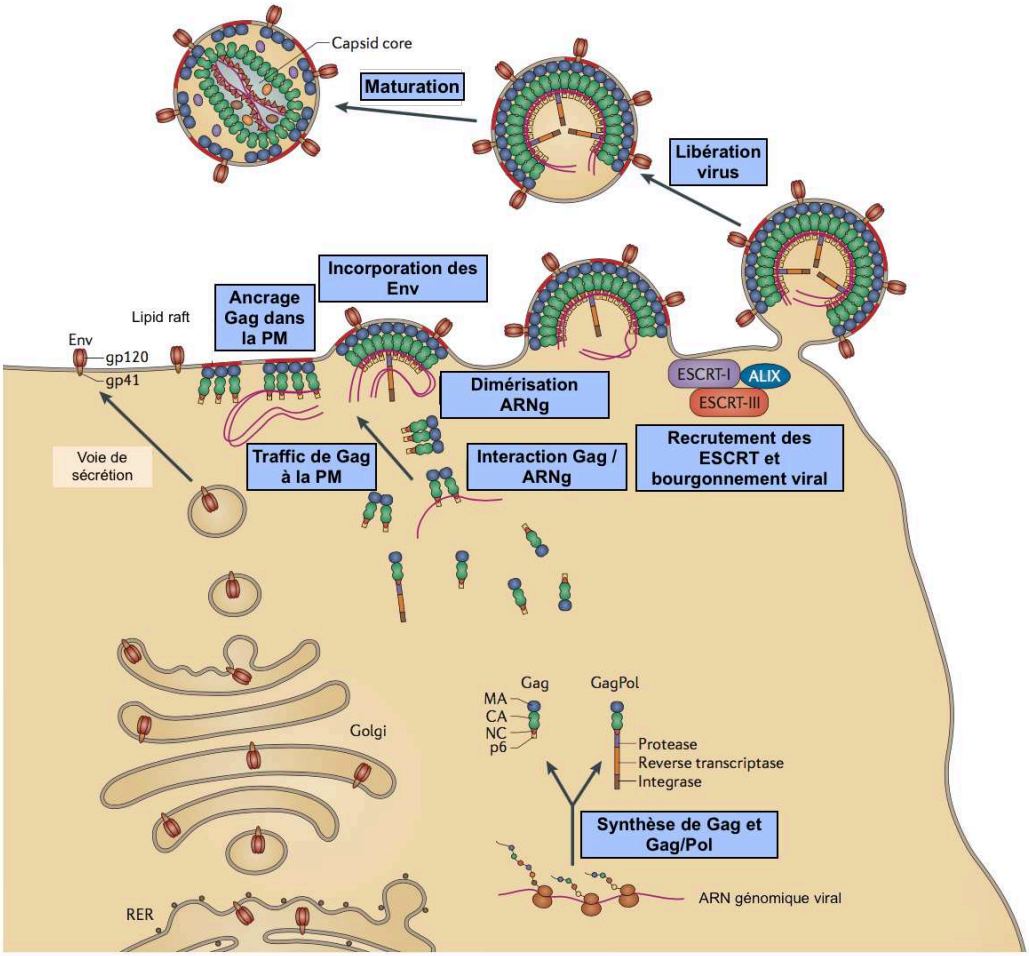


Figure 12 : Étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1.
Pour débuter la phase tardive, le provirus est transcrit par l'ARN polymérase de type II en plusieurs ARNm non-épissés, mono-épissés ou totalement épissés puis exportés dans le cytoplasme par différents mécanismes selon leur degré d'épissage (non-représenté). Les ARNm sont traduits dans le cytoplasme en protéines Gag et Gag-Pol par la machinerie traductionnelle de la cellule hôte. Les protéines Gag reconnaissent l'ARN génomique viral dimérisé dans le cytoplasme puis ce complexe migre à la membrane plasmique (MP) où Gag s'y ancre. Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées dans le RER puis transitent dans l'appareil de Golgi où elles sont maturées et enfin sont incorporées dans la PM pour être assemblées dans les virions. Le virus recrute les protéines du complexe ESCRT pour initier le bourgeonnement viral aboutissant au relargage d'une particule virale immature. Les virions subissent une étape de maturation permettant la production de particules virales infectieuses. (Adapté de Freed, 2015)

8.2.1. Transcription de l'ADN proviral

L'ADN proviral intégré dans le génome de la cellule hôte doit être transcrit avec les gènes cellulaires par l'action conjointe de facteurs viraux et cellulaires afin d'aboutir à la formation des protéines virales. Dans une cellule en état de latence, la transcription est réprimée d'une part par la condensation de la chromatine sous forme de nucléosomes empêchant l'accès aux facteurs de transcription et d'autre part par l'effet des histones déacétylases (Stevens et al., 2006). Pour initier la réactivation de la

transcription du VIH-1, le facteur de transcription NF-κB recrute des histones acéthyltransférases et des facteurs de remodulation de la chromatine, libérant ainsi la région promotrice et permettant l'accès des facteurs de transcription au promoteur central (TATA box) de la région U3 du 5'LTR. De courts transcrits contenant la région TAR sont formés et permettant la traduction de la protéine virale transactivatrice Tat. Tat assure l'activation de la transcription en créant un complexe avec P-TEFβ qui se fixe sur la région TAR puis forme avec d'autres facteurs cellulaires un complexe au niveau de l'ARN polymérase de type II, lui faisant subir une hyperphosphorylation. Sous l'action de Tat, l'ARN Pol II réalise une élongation plus active et synthétise des transcrits viraux complets (Lévesque et al., 2006; Liu et al., 2014).

8.2.2. Épissage et export nucléaire des ARNm

Les ARNm synthétisés doivent être exportés hors du noyau afin d'être traduits en protéines virales ou encapsidés dans les particules virales. Pour ce faire, l'ARNm nouvellement synthétisé et non-épissé subit une combinaison alternative de plusieurs épissages donnant naissance à plus de cinquante transcrits viraux (Emery and Swanstrom, 2021) (Figure 13). Initialement, l'ARNm viral est totalement épissé par la machinerie d'épissage cellulaire pour former un transcrit d'environ 2 kb qui donnera naissance aux protéines régulatrices Tat, Rev et Nef. Ces petits ARNm sont exportés hors du noyau par la voie d'export nucléaire classique et implique le facteur d'exportation Tap-Nxt1 et l'hélicase Dbp5 (Cullen, 2005). Les ARNm partiellement (4 kb) ou totalement épissés (9 kb) sont normalement retenus dans le noyau pour épissage ou dégradation et sont donc incapables d'utiliser la voie d'export nucléaire précédemment décrite. Leur export nucléaire est possible grâce à la protéine Rev qui se lie à la séquence RRE (*Rev Response Element*) présente dans le gène *env*, se multimérise et recrute le complexe cellulaire Crm1/Ran-GTP, permettant d'exporter les ARNm hors du noyau via le pore nucléaire (Figure 14). Les ARNm totalement épissés seront directement encapsidés dans les particules virales sous forme d'ARNg ou traduits en polyprotéines Gag et Gag-Pol tandis que les ARN mono-épissés formeront les protéines Env, Vpr, Vif et Vpu (Fernandes et al., 2012; Malim et al., 1989).

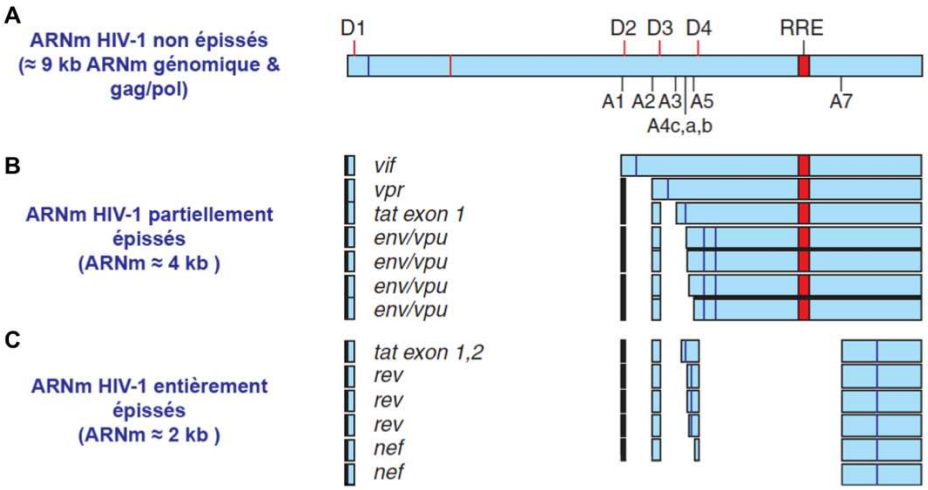


Figure 13 : Représentation non-exhaustive des différents transcrits et des sites d'épissages du VIH-1.
A) L'ARNm non-épissé d'environ 9 kb codant pour les précurseurs Gag et Gag/Pol est représenté avec les emplacements des sites donneurs d'épissage (barres rouges), les sites accepteurs d'épissage (barres noires) et le RRE (rectangle rouge). B et C) Les ARNm partiellement épissés d'environ 4 kb codant pour les protéines Env, Vif, Vpr, Vpu et contiennent le RRE tandis que les ARNm totalement épissés d'environ 2 kb codent pour les protéines Tat et Rev mais ne possèdent pas le RRE. La présence des exons dans chaque transcrit est représenté par des rectangles bleu ciel. L'exon 1 non-codant est présent dans chaque transcrit viral épissé tandis que les transcrits 2 et/ou 3 non-codants sont présents uniquement chez certains ARNm. L'emplacement du codon AUG utilisé pour l'initiation de la traduction de chaque transcrit en protéine est représenté par la barre violette dans chaque exon. (Adapté de Karn and Stoltzfus, 2012)

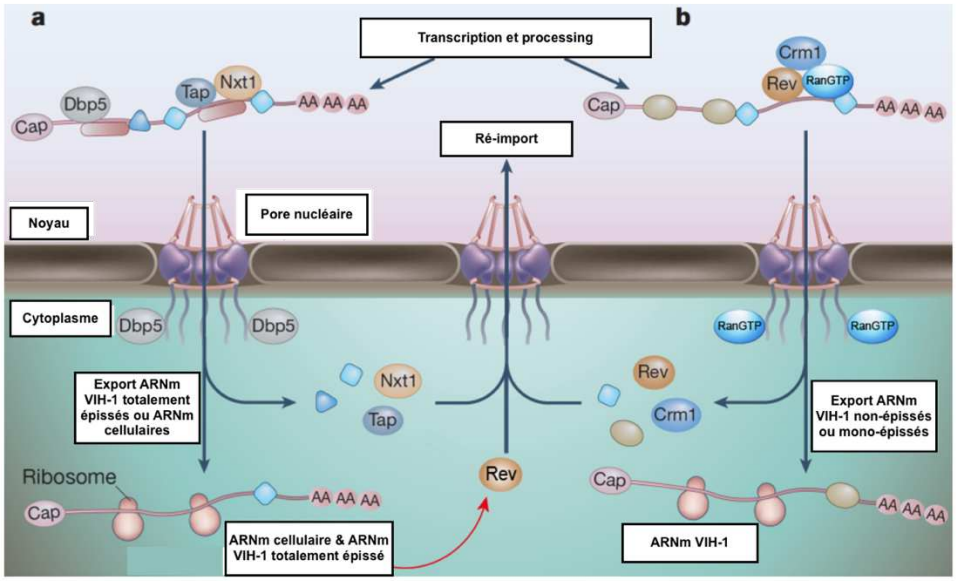


Figure 14 : Voies d'export nucléaire des ARNm du VIH-1.
a) Les ARNm cellulaires et totalement épissés du VIH-1 s'associent aux protéines du complexe Tap/Nxt1 et à l'hélicase Dbp5 pour être exportés dans le cytoplasme via le pore nucléaire. L'hélicase Dbp5 permet de remodeler les complexes et de libérer les facteurs cellulaires pour leur réimportation ultérieure dans le noyau. Les ARNm totalement épissés du VIH-1 sont traduits en protéines auxiliaires, notamment la protéine Rev, qui sera réimportée dans le noyau. b) Dans le noyau, les protéines Rev se lient à la séquence RRE des ARNm viraux mono-épissés et totalement épissés puis recrute le complexe d'export nucléaire Crm1/RanGTP afin d'exporter les transcrits dans le cytoplasme où ils seront traduits en protéines virales. (Adapté de Cullen, 2005)

8.2.3. Traduction des protéines virales

Dès leur arrivée dans le cytosol, les différents ARNm du VIH-1 sont traduits en protéines virales par la machinerie ribosomale de la cellule hôte (Bolinger and Boris-Lawrie, 2009). Le site d'initiation de la traduction AUG est présent dans la séquence d'encapsidation localisée dans le 5'UTR du VIH-1 (Karn and Stoltzfus, 2012). Cette région non-traduite possède un rôle clé dans la modulation de l'efficacité de synthèse des protéines virales, en s'associant avec divers facteurs de régulation cellulaires tels que l'ARN Hélicase A ou encore en utilisant plusieurs conformations stimulant ou non la traduction virale. Les ARNm épissés sont les premiers traduits et donnent naissance aux protéines régulatrices Tat, Rev et Nef. L'ARNm non-épissé forme les polyprotéines $Pr55^{Gag}$ et $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$. $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ est traduite grâce à l'utilisation d'un mécanisme nommé « frameshift -1 » utilisant deux séquences agissant en *cis* et permettant au ribosome de passer du cadre de lecture ouvert Gag à celui de Gag-Pol. Ce mécanisme se produit dans 5% des cas et aboutit à la synthèse d'une protéine Gag-Pol pour vingt protéines Gag produites (Karn and Stoltzfus, 2012). La polyprotéine Gag possède la capacité de réguler sa propre traduction selon sa concentration. En faible quantité, Gag stimule sa traduction grâce au domaine MA jusqu'à atteindre une quantité suffisante à la production de nouveaux virions. S'en suit une inhibition de sa traduction grâce à la liaison du domaine NC à la séquence Psi et l'initiation de l'assemblage viral (Anderson and Lever, 2006).

Une exception est faite pour l'ARNm partiellement épissé vpu/env, qui est traduit en polyprotéine gp160 dans le RER où ils y seront glycosylés et assemblés en trimères. Ils transitent ensuite dans l'appareil de Golgi où ils sont maturés par un clivage réalisé par les protéases cellulaires pour former les glycoprotéines d'enveloppe matures gp120 et gp41 qui seront adressés à la MP (Checkley et al., 2011).

8.2.4. Assemblage des particules virales

L'assemblage du VIH-1 fait intervenir plusieurs partenaires viraux (Gag, Gag-Pol, l'ARN viral génomique, Env …) et cellulaires ($tARN^{Lys,3}$) aboutissant formation de particules virales immatures au niveau de microdomaines nommés radeaux lipidiques (*lipids rafts*) de la MP cellulaire (Sundquist and Krausslich, 2012). Dans le cytoplasme, plusieurs monomères de la polyprotéine Gag recrutent spécifiquement un dimère d'ARNg puis migrent en direction de la PM où des protéines Gag additionnelles sont ajoutées et les glycoprotéines d'enveloppe sont incorporées (Bell and Lever, 2013; Freed, 2015; Hellmund and Lever, 2016; Tedbury and Freed, 2014). Toutes ces étapes se produisent simultanément et aboutissent à la formation de bourgeons viraux qui seront ensuite libérés dans le milieu extracellulaire. Mon sujet de thèse portant sur l'étude de l'assemblage du VIH-1, notamment

l'association entre le précurseur Gag et l'ARNg, ces mécanismes seront décrits et développés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

De façon concomitante à l'encapsidation du génome, la production de particules du VIH-1 infectieuses nécessite l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (Figure 15). La biogénèse des protéines d'enveloppe du VIH-1 débute par la synthèse du précurseur gp160 à partir de l'ARNm vpu/env mono-épissé dans le RER.

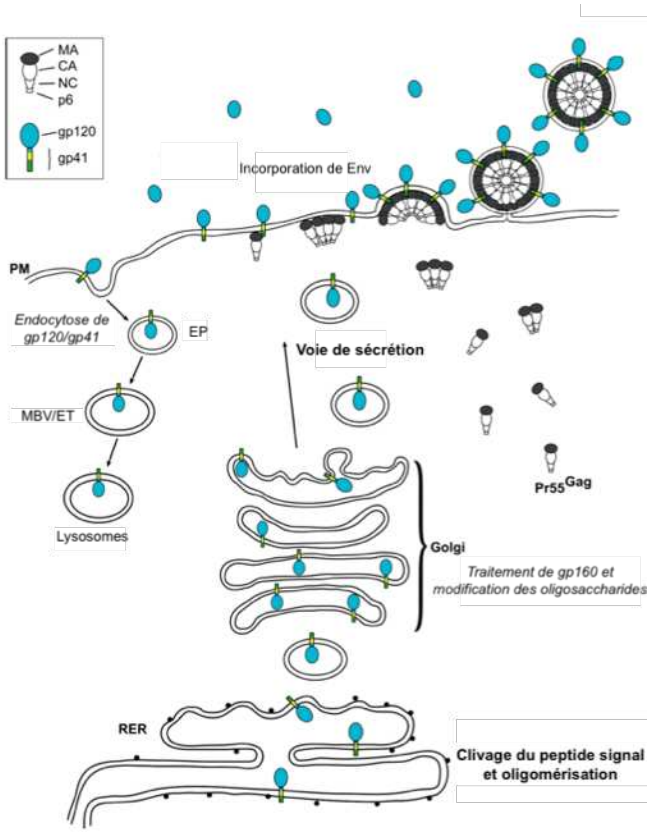


Figure 15 : Représentation du traffic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppes du VIH-1.
Env est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux (RER) en tant que précurseur gp160 qui s'oligomérise majoritairement en trimères. La protéine Gp160 est transportée dans le réseau de l'appareil de Golgi où elle est maturée en SU gp120 et TM gp41. Les complexes gp120-gp41 sont transportés à la MP via la voie de sécrétion et sont incorporés dans les virus sous forme de spicules trimériques. À la MP, l'endocytose de Env dans les endosomes précoces (EP) se produit grâce à l'interaction avec les complexes des adaptateurs de la clathrine. Les Env internalisés peuvent soit être transportés aux lysosomes pour dégradation via la voie des endosomes tardifs ou des corps multivésiculaires (MVB/ET), ou être relocalisés à la MP via le recyclage des endosomes (non-montré). Les domaines de Gag et Env sont définis dans l'insert en haut à gauche de la figure. (D'après Checkley et al., 2011).

Les monomères de gp160 s'oligomérisent en trimères dans ce même compartiment, ce qui facilite leur acheminement vers le réseau trans-Golgien où des oligosaccharides de mannose lui sont ajoutés et où elle est clivée et maturée par la furine en protéines SU (gp120) et TM (gp41) (Checkley et al., 2011).

Ce clivage protéolytique est indispensable à l'activation de l'activité fusogénique de Env ainsi qu'à l'infectivité virale (Hallenberger et al., 1992). Les glycoprotéines d'enveloppe sont adressées à la MP par la voie de sécrétion puis exprimées à la surface de la cellule (Figure 15). Les protéines d'enveloppe non intégrées dans des particules virales sont rapidement endocytées dans des vésicules de clathrine (Rowell et al., 1995).

De nombreuses études ont investigué le mécanisme d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions immatures. Ainsi, quatre modèles non exclusifs sont débattus et proposés (Checkley et al., 2011; Freed, 2015).

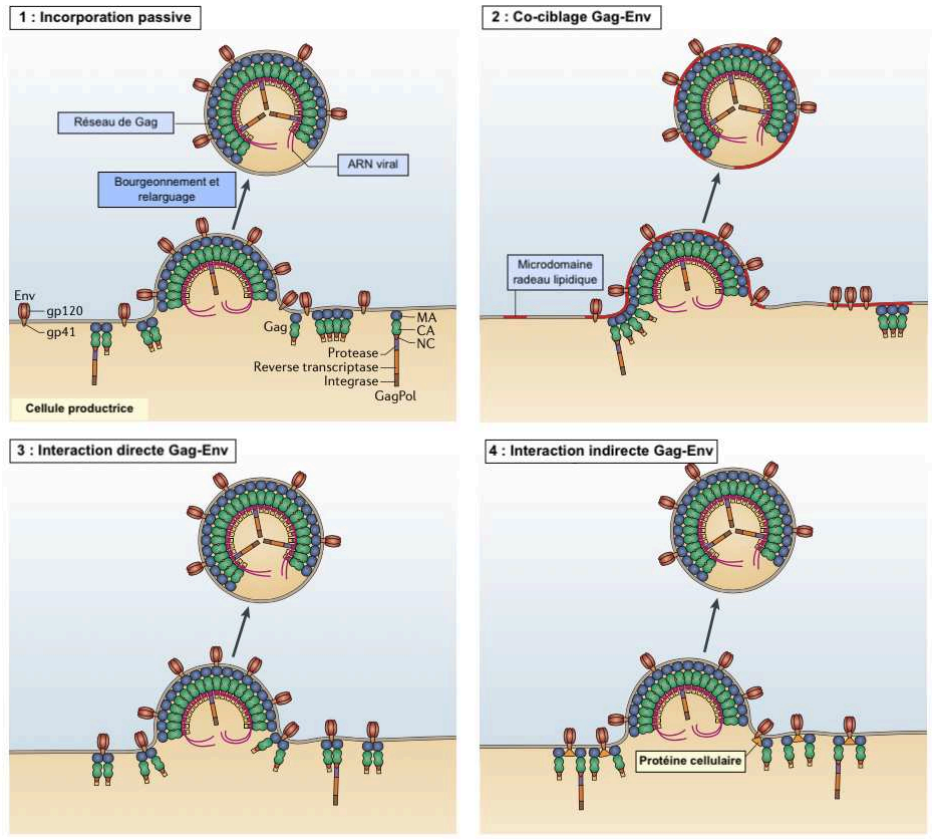


Figure 16 : Représentation de modèles potentiels d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1.
Plusieurs mécanismes non exclusifs peuvent potentiellement participer à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (Env) dans les particules virales. 1) Dans le premier modèle, les glycoprotéines d'enveloppe pourraient être incorporées passivement lors de l'assemblage et du bourgeonnement à travers la membrane de la cellule hôte. 2) Dans le deuxième modèle, il y aurait un lien direct Gag-Env avec une interaction entre le domaine MA et la queue cytoplasmique de la gp41, ce qui entrainerait la rétention de Env au site d'assemblage. 3) Dans le troisième modèle, un ciblage spécifique des microdomaines membranaires par Gag et Env se produirait lors de l'assemblage. 4) Dans le quatrième modèle, le domaine MA et la queue cytoplasmique de la gp41 pourraient également interagir indirectement par le biais d'une protéine cellulaire assurant leur liaison. (D'après Freed, 2015)

Le premier modèle est en faveur d'une incorporation passive de Env dans elles seraient incorporées dans les virions par le simple résultat de leur expression à la MP. Ce mécanisme ne requiert aucune concentration de Env à la MP (Figure 16A). Le deuxième modèle avance un « co-ciblage » de Gag et Env au niveau de structures cellulaires de type microdomaines (ex : radeaux lipidiques) présents à la MP, qui servirait de plateforme d'assemblage et recruterait Gag et Env (Figure 16B). Le troisième modèle est une interaction directe entre Gag et Env où le domaine MA de Gag se lierait à la queue cytoplasmique de la gp41 pour recruter Env dans les virions (Figure 16C).
Le quatrième modèle postule pour une interaction indirecte de Gag et de Env avec l'existence d'une protéine cellulaire assurant le lien entre Gag et Env pour promouvoir l'incorporation de Env (Figure 16D).

8.2.5. Bourgeonnement et relargage des particules virales

L'assemblage du réseau de Gag au niveau de la MP induit une courbure négative celle-ci, initiant le bourgeonnement viral. Le VIH-1 usurpe le complexe cellulaire ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) impliqué dans tri endosomal des protéines ainsi que dans les réactions de fissions membranaires permettant de séparer deux cellules filles ou de libérer des corps multi-vésiculaires endosomaux (MVB ou Multi-Vesicular Bodies) (Martin-Serrano and Neil, 2011). Cette machinerie cellulaire catalyse le bourgeonnement viral et libère les particules virales néo-synthétisées dans le milieu extracellulaire. Le domaine p6 de Gag contient deux domaines dits « tardifs » impliqués dans le recrutement des protéines ESCRT (Rose et al., 2020). Le premier motif « PTAP » recrute la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I et est essentiel à la libération virale. Le second motif « XPXL » est moins important dans le bourgeonnement mais reste nécessaire grâce à sa liaison avec la protéine ALIX (Freed, 2015; Fujii et al., 2009; Hurley and Cada, 2018; Sundquist and Krausslich, 2012; Usami et al., 2009). Tsg101 et ALIX recrutent à leur tour les complexes ESCRT-III, notamment les sous-unités CHMP4 et CHMP2 formant des filaments spiralés au niveau du cou du bourgeon. Ces filaments créent des dômes qui resserrent les membranes opposées pour réaliser leur fission. La protéine VPS4 est également recrutée pour assister le complexe ESCRT-III et également pour terminer la fission et recycler les facteurs ESCRT grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (Figure 17A). Deux modèles d'utilisation des complexes ESCRT ont été proposés dans la communauté scientifique (Figure 17B). NC possède également un rôle dans le bourgeonnement en coopérant avec le domaine PTAP de p6 pour le recrutement d'ALIX (Dussupt et al., 2009; Popov et al., 2008) et de Tsg101 (Chamontin et al., 2015; El Meshri et al., 2018) .

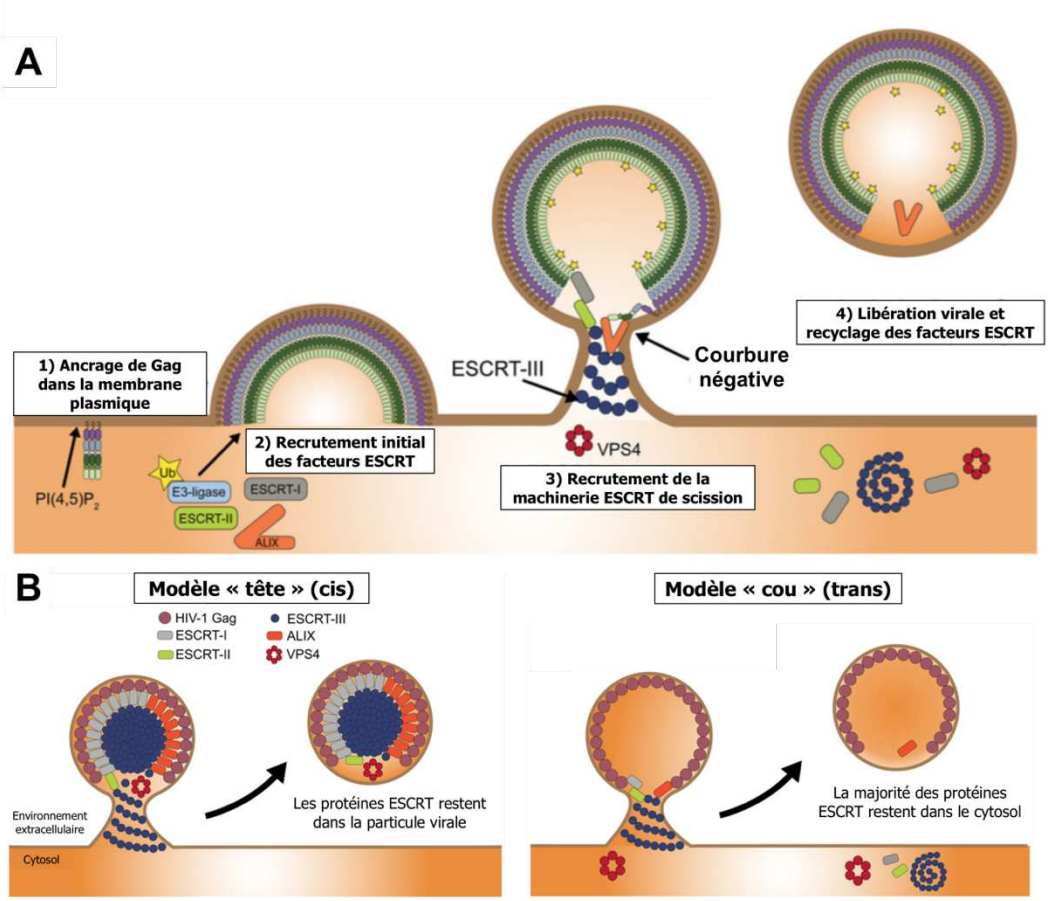


Figure 17 : Mécanisme de bourgeonnement du VIH-1.
A : Le domaine MA permet l'ancrage de la polyprotéine Gag dans le feuillet interne de la MP en se liant aux $PI(4,5)P_2$ (1). L'accumulation de Gag à la PM provoque la courbure de la membrane et la formation d'un bourgeon viral accompagné par le recrutement du complexe ESCRT via le recrutement de Tsg101 ou d'ALIX (2). La libération de la particule virale de la cellule implique la machinerie de scission ESCRT-III et VPS4 (3) aboutissant à la libération d'une particule virale immature (4). B : Deux modèles d'implication du complexe ESCRT dans le bourgeonnement viral ont été proposés. Dans le modèle en *cis*, le complexe ESCRT-III est localisé dans la particule virale en bourgeonnement et entraine la scission membranaire. Dans le modèle en *trans*, les complexes ESCRT-I , ESCRT-II et ALIX sont disposés dans le bourgeon et recrutent ESCRT-III qui permet la scission de la particule virale principalement à l'extérieur (Adapté de Hurley and Cada, 2018).

8.2.6. Maturation des particules virales

La maturation virale est initiée de façon concomitante au bourgeonnement viral ou rapidement après. Ce processus permet la production des protéines virales matures MA, CA, NC, p6, PR, RT et IN grâce au clivage par la protéase virale de dix sites différents présents sur les polyprotéines Gag et Gag-Pol (Bell and Lever, 2013). Le premier clivage dans Gag se produit entre le peptide Sp1 et le domaine NC, libérant les fragments MA-CA-Sp1 (p41) et NC-Sp2-p6 (p15). Les seconds clivages se produisent entre de domaine MA et CA libérant la protéine MA (p17) du fragment CA-Sp1 (p25) ainsi qu'entre le fragment NC-Sp2 (p9) et le domaine p6. Enfin, le processus de maturation s'achève par les clivages entre CA (p24) et Sp1 mais également entre NC (p7) et Sp2 (Figure 18). Le réarrangement de ces

protéines au cours de la maturation permet la formation de particules virales matures possédant une première couche de protéines MA reliées à la MP et d'une capside condensée avec la morphologie caractéristique en « cône » renfermant le génome viral lui-même condensé avec les protéines NC (Freed, 2015 ; Sundquist and Krausslich, 2012). Cette étape marque la fin du cycle de réplication du VIH-1 et permet aux virus formés d'infecter de nouvelles cellules cibles.

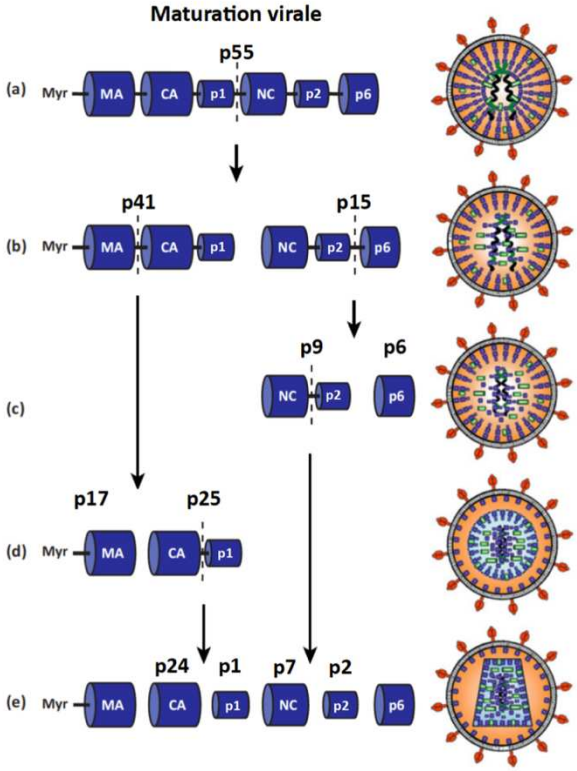


Figure 18 : Étapes de la maturation protéolytique du VIH-1 et réarrangements morphologiques.
La maturation virale est le clivage protéolytique des précurseurs $Pr55^{Gag}$ et $Pr160^{Gag\text{-}Pol}$ (non-représenté) par la protéase virale, représentés à gauche de la figure (a-e). Ces clivages séquentiels s'accompagnent de réarrangements morphologiques au sein de la particule virale représentés à droite de la figure. Une particule virale mature possédant une capside conique caractéristique est ainsi formée. (D'après Bell and Lever, 2013)

Partie 2 : Assemblage du VIH-1 et interaction de la protéine Gag avec l'ARN génomique viral

1. Structure détaillée du précurseur Gag

Le gène *gag* est présent sur les ARNm non-épissés et code pour la polyprotéine virale Gag ($Pr55^{Gag}$). Cette protéine coordonne les activités essentielles à l'assemblage du virus, notamment la liaison au feuillet interne de la MP, la formation de particules virales sphériques immatures et l'encapsidation de l'ARNg via les séquences d'encapsidation Psi. La polyprotéine Gag assure à elle seule la formation et le relargage de pseudo-particules virales non-infectieuses nommées VLP (*Virus Like Particules*) (Gheysen et al., 1989).

Le précurseur Gag (55 kDa) est composé de 500-550 aa séparés en quatre domaines majeurs désignés selon leur fonction : le domaine de matrice MA allant des aa 2 à 132 (17 kDa), le domaine de capside CA allant des aa 133 à 363 (24 kDa), le domaine nucléocapside NC allant des aa 378 à 432 (7 kDa) et le domaine p6 allant des aa 449 à 500 (6 kDa) (Adamson and Freed, 2007; Bell and Lever, 2013). La protéine Gag abrite également deux peptides courts, les peptides d'espacement : Sp1 séparant les domaines CA et NC et allant des aa 364 à 377 ainsi que Sp2 séparant les domaines NC et p6 et allant des aa 433 à 500 (Source : UniProtKB – P04591 (GAG H1H2) ; Figure 19).

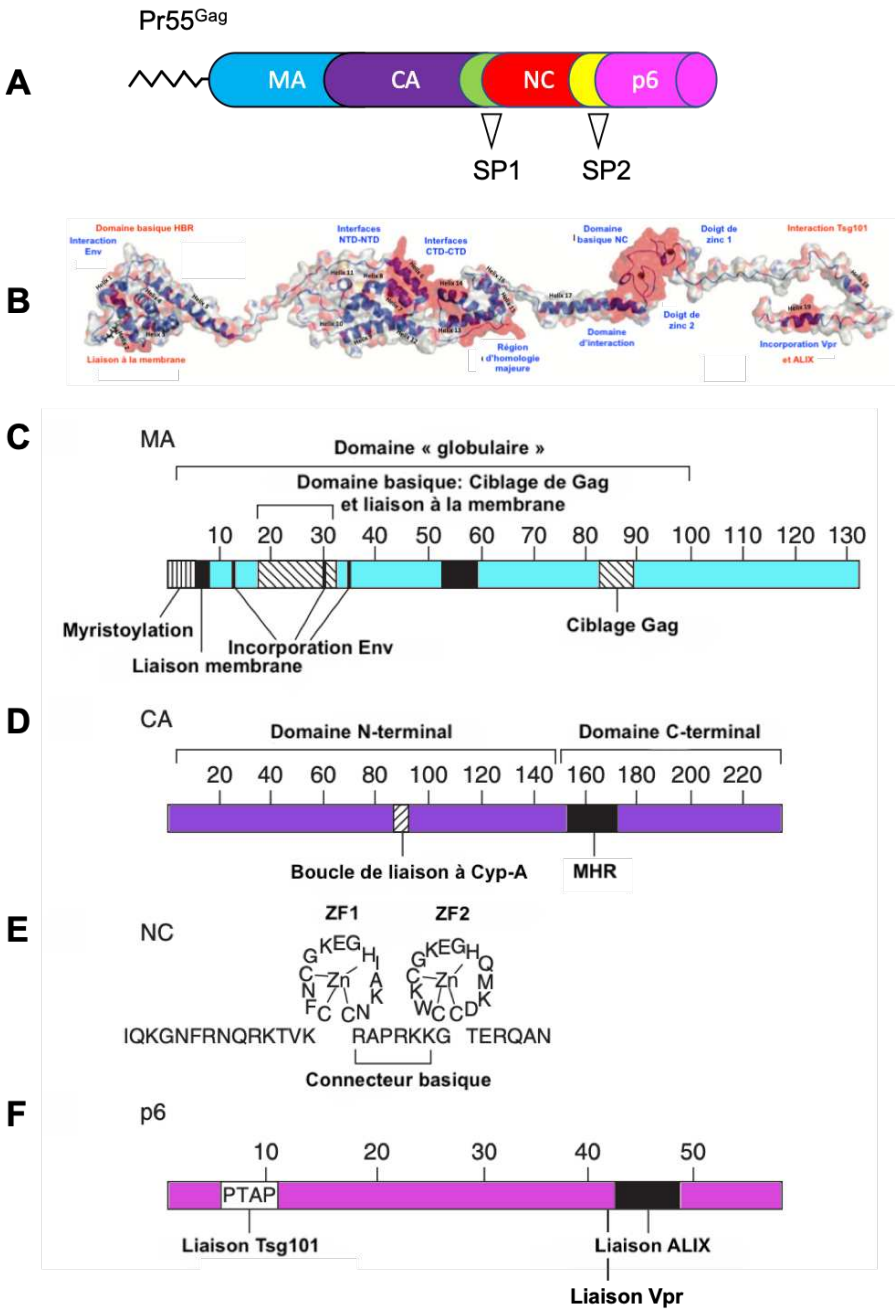


Figure 19 : Représentation schématique de la polyprotéine Gag, de sa structure à haute résolution et des domaines la composant.

A) Position des domaines de matrice myristoylé (MA), de capside (CA), de nucléocapside (NC) et p6 ainsi que les peptides d'espacement SP1 et SP2 dans la polyprotéine Gag et ses six domaines sont représentés. B) Structure à haute résolution de Gag mettant en évidence les régions responsables de l'interaction de Gag avec les protéines de l'hôte (annotées en rouge) et avec les protéines virales (annotées en bleu). C) Le domaine MA et ses différentes régions contribuant à l'assemblage du virus, la liaison à la MP, les étapes post-entrée et l'incorporation de Env sont représentés. La région de MA formant le domaine globulaire et la région basique sont indiqués. D) Le domaine CA est composé du domaine « core » N-terminal et « dimérisation » C-terminal. Le site de fixation de CypA et la région d'homologie majeure (MHR) sont indiqués. E) La séquence primaire de la NC et les deux doigts de zinc sont représentés. F) Le domaine p6 et ses trois domaines fonctionnels sont indiqués. La position des aa est indiquée au-dessus de chaque schéma. (Adapté de Bell and Lever, 2013 et d'Adamson and Freed, 2007)

1.1. Le domaine MA

Le domaine de matrice MA (p17) qui est composé de 132 aa est présent en position N-terminale de Gag. La structure tridimensionnelle de MA, montre son repliement en un core central composé de cinq hélices alpha, deux petites hélices 3_{10} et un feuillet beta mixte à trois brins (Verli et al., 2007). La 5ème hélice alpha en C-terminal de MA est projetée hors du domaine globulaire à l'opposé de la MP et permet la connexion avec le domaine de capside de Gag (Bukrinskaya, 2007). MA est modifiée post-traductionnellement par l'attachement covalent d'un acide myristique. La forme active de MA est un trimère (Figure 20) qui est indispensable pour assurer ses différentes fonctions dans le cycle viral.

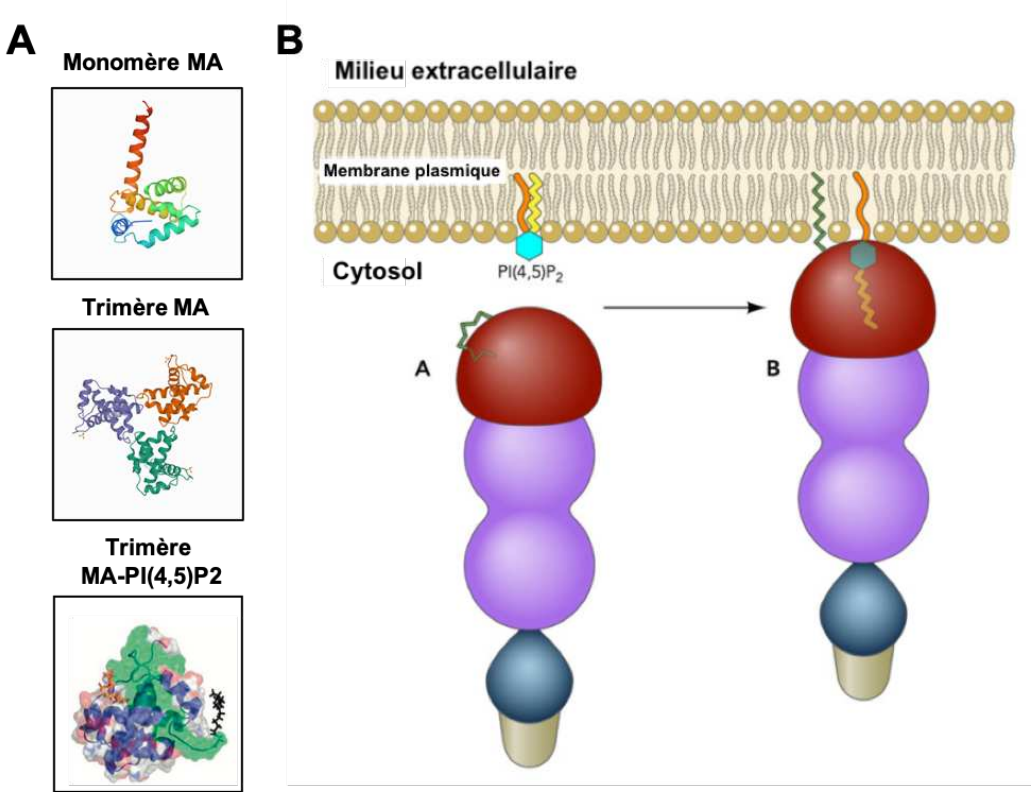


Figure 20 : Structure tridimensionnelle des monomères et trimères du domaine MA du VIH-1 et liaison à la membrane plasmique.
A) Structure tridimensionnelle d'un monomère myristoylé de MA et structure cristalline d'un trimère où chaque sous-unité de MA est représentée par une couleur différente (PDB: 2H3I et 1HIW). La troisième image représente l'interaction entre les trimères de MA et le PI(4,5)P2 (en vert) (PDB : 2h3q). (D'après Bell and Lever, 2013). B) Représentation schématique de l'interaction entre MA et PI(4,5)P2 induisant l'exposition du myristate et l'ancrage de Gag dans le feuillet interne de la bicouche lipidique de la MP. De concert avec la multimérisation de Gag, l'interaction MA-PI(4,5)P2 déclenche l'exposition du myristate qui vient s'ancrer dans la bicouche lipidique de la MP.

Lors de l'assemblage viral, MA permet l'ancrage de Gag au niveau de microdomaines de la MP, les radeaux lipidiques (Lindwasser and Resh, 2001; Thornhill et al., 2020). Ces domaines sont riches en lipides saturés (phosphatidylsérine et phosphatidylethanolamine) et en cholestérol. Cela est possible

grâce à la présence d'un signal bipartite dans la MA. Tout d'abord, MA assure des interactions électrostatiques avec les têtes anioniques des phospholipides du feuillet interne de la MP grâce à la séquence HBR (*Highly Basic Region*) hautement basique, riche en lysines et présente entre les résidus 14 et 31 (Chukkapalli and Ono, 2011; Vlach and Saad, 2013). L'HBR interagit spécifiquement avec le phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PI(4,5)P2) qui assure un adressage spécifique de Gag à la MP (Chukkapalli et al., 2008; Ono et al., 2004; Saad et al., 2006). Seuls les PI(4,5)P2 produits par les kinases PIP5K1 α et γ sont impliquées dans le ciblage de Gag à la PM (Gonzales et al., 2020). Une étude récente a montré que Gag restreint spécifiquement la mobilité du (PI(4,5)P2) et du cholestérol dans la membrane afin de créer un microenvironnement favorable à l'assemblage (Favard et al., 2019). Cette interaction ainsi que la multimérisation de Gag déclenche le second signal qui correspond à l'exposition et l'ancrage du myristate dans le feuillet interne de la MP. Le myristate est présent sous deux conformations : une conformation séquestrée où il est niché dans la poche hydrophobe formée par la tête globulaire de MA et une conformation exposée lui permettant de s'ancrer dans la membrane (Saad et al., 2007). L'insertion du myristate dans la PM permet le tri des lipides présents autour du site de liaison dans la PM afin de préparer l'assemblage et le relargage des virions (Monje-Galvan and Voth, 2020).

Le domaine MA possède également la capacité de se lier de façon non-spécifique aux acides nucléiques. Le domaine HBR possède des sites de liaison chevauchants pour le (PI(4,5)P2) et pour les ARN viraux et cellulaires (Alfadhli et al., 2011). Plusieurs études suggèrent un modèle dans lequel la liaison de MA aux acides nucléiques inhiberait ainsi la liaison de Gag aux membranes ne possédant pas de PI(4,5)P2 (Todd et al., 2017). Ces mécanismes de liaison opposé aux acides nucléiques et aux lipides réguleraient ainsi la liaison de Gag à la MP (Chukkapalli et al., 2010).

Le domaine MA serait également impliqué dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les particules virales, malgré plusieurs controverses au sujet du mécanisme d'incorporation (Checkley et al., 2011; Murakami and Freed, 2000; Murphy et al., 2017; Murphy and Saad, 2020). La queue cytoplasmique de la protéine d'enveloppe gp41 s'insère dans le trou central formé par les trimères de MA (Alfadhli et al., 2019; Tedbury and Freed, 2015).

Récemment, une étude de Briggs et Krausslich a démontré que MA subissait des réarrangements structuraux pendant la maturation virale, comme c'est le cas pour CA et la formation d'une capside conique (Qu et al., 2021). MA s'assemble en hexamères de trimères à la fois dans les virions immatures et matures, mais les réarrangements de MA dans les formes immatures et matures sont très différents. Les virions immatures contiennent des trimères de MA assemblés ensemble par leur région N-

terminale en une structure hexagonale peu ordonnée contenant des poches chargées négativement et des régions désordonnées, qui pourraient accueillir les queues cytoplasmiques d'Env. Inversement, les virions matures contiennent des trimères de MA rassemblés ensemble grâce à leurs domaines HBR, résultant en une structure hexagonale ordonnée avec des poches neutres. La maturation module également la bicouche lipidique du virus en ôtant un nombre conséquent de lipides du feuillet interne de la membrane virale, afin de préparer potentiellement le virus aux étapes d'entrée et de fusion.

1.2. Le domaine CA

Le domaine de capside CA (p24) est formé de 231 aa et possède deux domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD) reliés par un court peptide flexible. Le NTD est monomérique et contient sept hélices alpha suivies par une boucle riche en prolines menant au CTD. Ce dernier contient trois hélices suivies par une rangée de quatre hélices alpha (Figure 21A). Le CTD est un domaine globulaire composé de quatre hélices alpha, d'une hélice 3_{10} et d'un brin étendu (Gamble, 1997; Ganser-Pornillos et al., 2012).

Lors de l'assemblage, le domaine CA permet les interactions protéines-protéines entre monomères de Gag qui assurent la formation de la particule virale (Mateu, 2009). La région NTD n'est pas essentielle pour l'assemblage de la capside immature, tandis que le domaine CTD se dimérise en solution (Gamble, 1997; Rosé et al., 1992). Après la maturation, environ 1500 monomères de capside s'assemblent et se réorganisent en une structure conique de type fullerène typique des particules virales matures du VIH-1 (Figure 21 B). Dans ces virions matures, le domaine NTD permet la formation d'anneaux symétriques de deux types formant les unités de base de la capside mature : environ 250 hexamères et 12 pentamères (Figure 21 C et D respectivement) (Briggs and Kräusslich, 2011; Ganser-Pornillos et al., 2012). Le domaine CTD forme des homodimères qui relient les anneaux hexamèriques et pentamériques du NTD en un pseudo maillage à trois axes (Figure 21 E). L'hélice 14 du CTD serait importante pour la dimérisation de CA, notamment la séquence hydrophobe centrale. En effet, la mutation des résidus W184 et M185 bloque la dimérisation du CA-CTD et diminue la production de particules virales (Burniston et al., 1999; von Schwedler et al., 2003). Le CTD héberge un domaine de 20 aa fortement conservé parmi les rétrovirus, la région d'homologie majeure (MHR) (Gamble, 1997; Perilla and Gronenborn, 2016). Le MHR est important pour plusieurs étapes du cycle de réplication viral, notamment l'assemblage de la capside mature où il intervient dans l'interface NTD-CTD (Mateu, 2009). La région reliant le NTD au CTD est importante pour un assemblage correct du core, pour la réplication virale ainsi que pour l'infectivité (Jiang et al., 2011).

Le domaine CA possède la capacité de s'associer avec plusieurs facteurs de l'hôte, certains stabilisant la capside (CypA), d'autres ayant un effet antiviral lors de l'entrée de capside dans une cellule en inhibant la décapsidation et en la redirigeant vers le protéasome (TRIM5α) et enfin plusieurs assistant l'import nucléaire (transportines et nucléoporines) (Mascarenhas and Musier-Forsyth, 2009). La capside est également capable d'interagir avec les composants du cytosquelette, notamment la dynéine et la kinésine, afin d'atteindre le noyau (Perilla and Gronenborn, 2016).

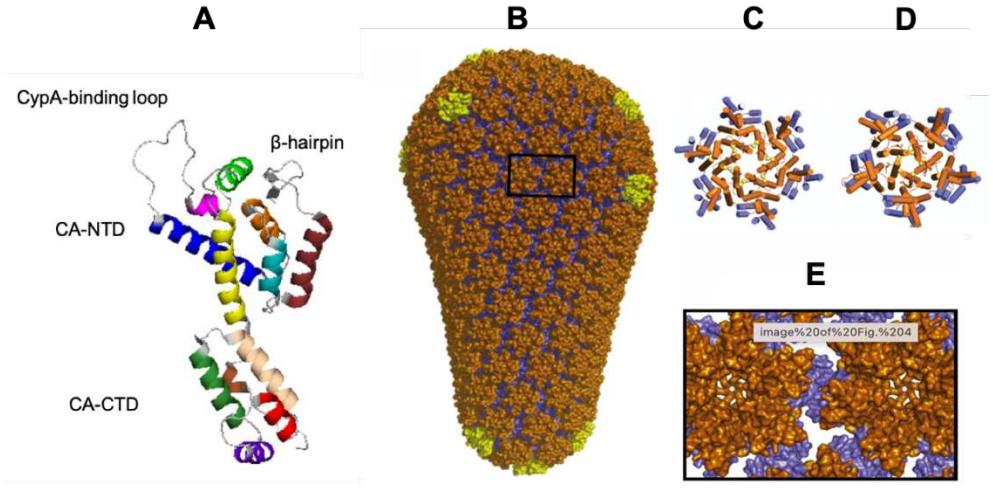


Figure 21 : Structure tridimensionnelle du domaine CA et architecture de la capside mature du VIH-1. A) Structure d'un monomère de CA composé de ses deux domaines CA-NTD (7 hélices alpha) et CA-CTD (4 hélices alpha et une hélice 3_{10}) reliés par un court connecteur. La boucle de liaison à CypA et l'épingle β sont indiqués (PDB: 5MCX) (D'après Novikova et al., 2019). B) Structure de la capside conique mature du VIH-1 composée de 1 056 sous-unités de CA. Les hexamères, les pentamères et les dimères sont colorés en orange, jaune et bleu respectivement. C et D) Structures cristallines d'un pentamère (C) et d'un hexamère (D) de la CA (vue de dessus). Les structures hélicoïdales sont représentées sous forme de cylindres avec les domaines NTD et CTD colorés en orange et violet, respectivement. E) Illustration à plus fort grossissement de la région entourée dans (A) représentant les interactions entre le domaine CA-NTD (en orange) et le domaine CA-CTD (en bleu). (D'après Pornillos et al., 2011)

1.3. Le peptide SP1

Le peptide SP1 (ou p2) est composé de 14 aa et assure la liaison entre les domaines CA et NC. Ce peptide est linéaire en solution mais subit des changements conformationnels menant à son réarrangement en hélices alpha avec le domaine C-terminal de CA (Figure 22 A) (Datta et al., 2011). L'augmentation de la concentration de Gag entraine un changement de conformation aboutissant au repliement de la jonction CA-SP1, au remaniement du NTD de CA et à l'exposition de nouvelles régions augmentant les interactions entre CA et permettant l'oligomérisation de ce domaine (Datta et al., 2016). Dans les hexamères de CA, SP1 assure une base en se regroupant dans un faisceau à six hélices (Figure 22 B), régulant la protéolyse pendant l'assemblage et connectant CA à la NC liée à

l'ARNg (Mendonça et al., 2021; Wagner et al., 2016). Des mutations dans la jonction CA-SP1 et dans les premiers aa de SP1 induisent une perturbation des interactions Gag-Gag, empêchent la formation de la capside conique mature et mènent à la formation particules ressemblant à des virus immatures (Accola et al., 1998; Datta et al., 2011; Gross, 2000). Le clivage entre CA et SP1 est essentiel pour la condensation des protéines CA lors de la maturation (Datta et al., 2016; Mattei et al., 2018). Ainsi, SP1 permet d'initier et de stabiliser les interactions CA-CA requises pour la formation d'une particule virale immature, la multimérisation de Gag mais également pour la réorganisation des protéines virales lors du processus de maturation. Le domaine SP1 est également impliqué dans la dépendance du VIH-1 à la voie ESCRT lors du bourgeonnement viral (Popova et al., 2010).

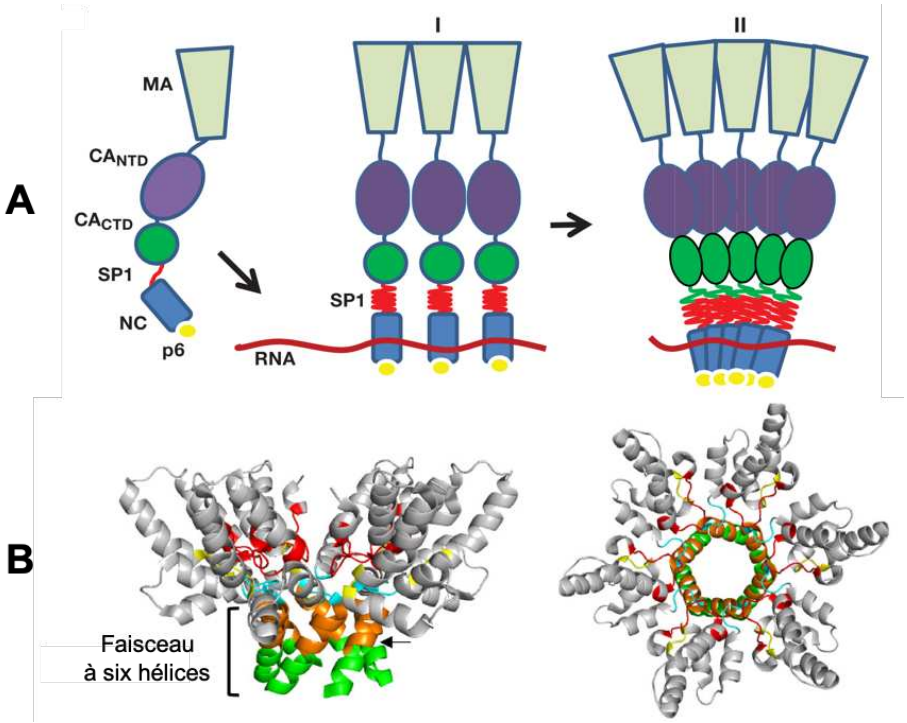


Figure 22 : Réarrangement conformationnel du peptide SP1 lors de l'assemblage du VIH-1.
A) Lorsque plusieurs molécules de Gag se lient à un même ARN viral, leur concentration locale augmente et la région SP1 adopte une conformation en hélice (I). Ce changement conformationnel se propage dans le domaine CA, aboutissant à la multimérisation de Gag et à la formation d'une particule immature sphérique (II). (D'après Datta et al., 2016) B) Représentation du CA-CTD et des sept résidus N-terminaux de SP1 formant un faisceau à six hélices (gauche : vue de profil, droite : vue du dessus). Les résidus de SP1 (vert), CA-CTD (orange), la boucle MHR (rouge), la boucle connectant les hélices 9 et 10 (bleu), et un repliement β (jaune) sont les éléments clés pour la formation du faisceau CA-SP1 dans les particules virales immatures Gag (PDB: 5I4T). La flèche indique le clivage entre CA et SP1 (D'après Novikova et al., 2019)

1.4. Le domaine NC

Le domaine de nucléocapside NC est composé de 55 aa et contient deux domaines liant les ions Zn^{2+} (ZF1 et ZF2) avec une forte affinité (Berg, 1986; Bess et al., 1992; Mely et al., 1991; Morellet et al., 1992; South et al., 1990; Summers et al., 1992) (Figure 23). Les doigts de zinc sont chacun formés

d'un motif $CX_2CX_4HX_4X$ et séparés par un domaine basique RAPRKKG (Morellet et al., 1992; Summers et al., 1992). Des études par RMN ont démontré que les ZF adoptent une structure globulaire (South et al., 1990) proches dans l'espace grâce au repliement du domaine RAPRKK (Morellet et al., 1992). Ce rapprochement crée un plateau hydrophobe formé des résidus Val 13, Phe 16, Ile 24 et Ala 25 pour le ZF1 et Trp37, Gln 45 et Met 46 pour le ZF2, essentiel pour l'interaction entre la NC et les oligonucléotides des AN (Mouhand et al., 2020). L'orientation spatiale des ZF et leur proximité sont des paramètres importants pour l'interaction avec l'ARNg et la formation de particules virales matures infectieuses. Cela permet aux résidus aromatiques F16 et W37 de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques et ce complexe est stabilisé par des interactions électrostatiques et hydrophobes avec les résidus basiques de la NC (Mouhand et al., 2020).

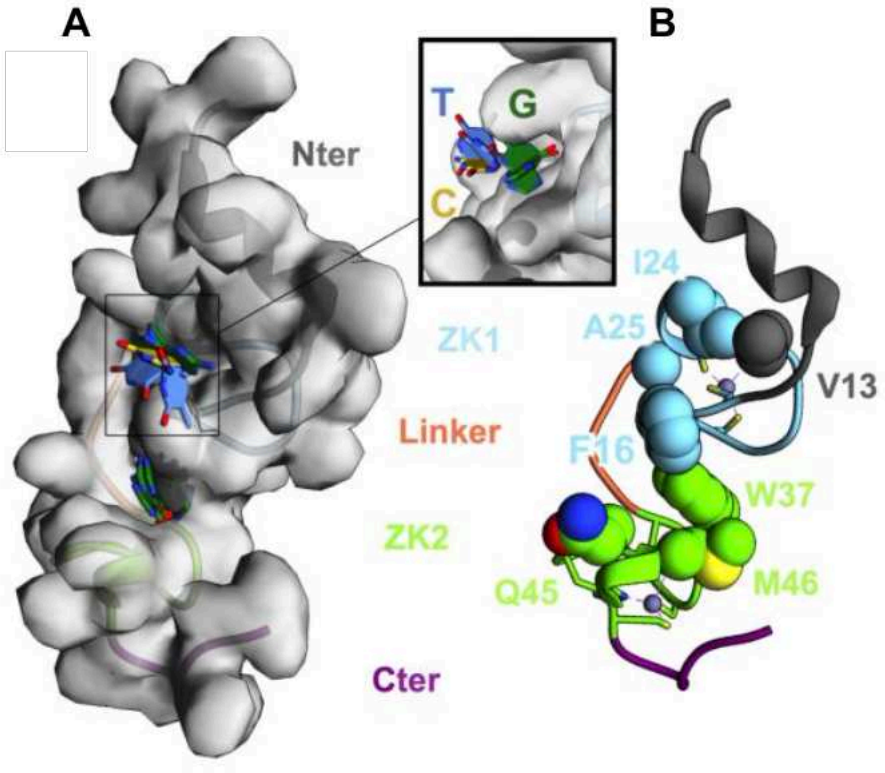


Figure 23 : Structure tridimensionnelle de la NCp7 du VIH-1 et de son interface avec les acides nucléiques.

A) Surface de la protéine NCp7 en complexe avec la tige-boucle SL3, montrant la localisation des deux poches de liaison des acides nucléiques dans chaque doigt de zinc (PDB: 1A1T). Le squelette de la NCp7 est coloré afin de mettre en avant ses différentes régions. Les bases azotées liées aux poches de la NCp7 sont représentées par des anneaux pleins et colorées selon le type de base (voir l'insert). B) Structure 3D de la NCp7, dont la chaîne latérale des résidus liant les AN sont représentés par des sphères de Van der Waals. Le premier doigt de zinc (ZK1 ou ZF1) est en bleu, le second doigt de zinc (ZK2 ou ZF2) est en vert et les résidus les liant sont en orange. Les ions Zn^{2+} sont représentés par des petites sphères grises, tandis que les résidus participant à la structure des doigts de zinc sont représentés par des barres. (D'après Mouhand et al., 2020)

Le domaine NC assure de multiples rôles dans la réplication virale dont notamment la recrutement et l'encapsidation d'un dimère d'ARNg grâce à son interaction avec le signal d'encapsidation Psi (ψ) présent dans la région 5'UTR lors de l'assemblage viral (D'Souza and Summers, 2005; Kuzembayeva et al., 2014). Cette partie sera détaillée dans les chapitres suivants. Le domaine NC participe également à la multimérisation de Gag pour former les particules virales immatures en condensant Gag sur les AN (Burniston et al., 1999; Muriaux and Darlix, 2010).

Les doigts de zinc du domaine NC seraient également impliqués dans le bourgeonnement viral, étant donné que leur mutation diminue la libération de virus (Dawson and Yu, 1998; Zhang and Barklis, 1997). Ils sont capables notamment de recruter avec le domaine p6 la protéine Tsg101 appartenant à la machinerie ESCRT I (Chamontin et al., 2015; El Meshri et al., 2018). Ces domaines dactyles ainsi que les résidus basiques de la NC possèdent également la capacité de se lier au domaine BroI de la protéine ALIX et de coopérer avec les domaines tardifs de p6, soulignant le rôle du domaine NC dans le recrutement de facteurs cellulaires nécessaires au relargage des particules virales (Dussupt et al., 2011, 2009; Popov et al., 2009, 2008). L'ARN viral serait également impliqué dans ce processus (Sette et al., 2012).

Pendant ou rapidement après le bourgeonnement, la protéase virale clive le précurseur Gag lors de la maturation, il en résulte la formation de trois produits de clivage de Gag contenant la NC : deux formes immatures (NCp15 et NCp9) et une forme mature (NCp7) (Bell and Lever, 2013). NCp7 possède une capacité de fixation supérieure aux AN, soulignant le rôle important du clivage complet de Gag pour une activité maximale de ce domaine.

L'activité principale de la NCp7 sous forme libre (particule mature) ou sous forme de domaine de Gag (particule immature) est de chaperonner des AN en remodelant leur structure et en leur permettant d'adopter une conformation thermodynamique plus stable (Darlix et al., 1990; Darlix et al., 2011; De Rocquigny et al., 1992; Godet et al., 2011; Prats et al., 1988; Rein, 2010). Cette fonction est essentielle pour l'hybridation de l'ARNt sur le PBS, lors de la dimérisation et lors de tout le processus de RT (Bampi, 2004; Levin et al., 2010). La NCp7 stimulerait également l'intégration du génome viral (Carteau et al., 1997).

Enfin, la NCp7 en complexe avec l'ARNg se lie à divers facteurs cellulaires (Stau1, ABCE1, Bro1, Actine…) et agit dans différentes étapes du cycle de vie du VIH-1 (Muriaux and Darlix, 2010).

1.5. Le peptide SP2

Le peptide SP2 (ou p1) est composé de 16 aa avec notamment deux résidus prolines hautement conservées en position 439 et 435 qui joueraient un rôle important dans la réplication du VIH-1 car leur mutation diminue la stabilité de l'ARN encapsidé (Bell and Lever, 2013). Contrairement à SP1, SP2 ne semble pas posséder un rôle essentiel dans l'assemblage du virus étant donné que sa délétion n'aboutit qu'à une faible réduction de l'infectivité virale et n'induit pas de changements majeurs dans la morphologie de la capside mature (de Marco et al., 2012). En revanche, ce peptide serait important dans l'incorporation de Gag et de Gag-Pol dans les virions immatures (Hill et al., 2007).

1.6. Le domaine p6

Le domaine p6 en C-terminal de Gag est composé de 52 aa et est hautement riche en prolines. En solution, p6 adopte une structure avec deux hélices alpha connectées par une région flexible. L'hélice 18 est adjacente au site de liaison pour la protéine Tsg101 et l'hélice 19 contient les sites de fixation aux protéines ALIX et Vpr (Figure 24) (Bachand et al., 1999; Fossen et al., 2005). Le domaine p6 est impliqué dans les étapes tardives du cycle viral, notamment dans le recrutement des protéines ESCRT permettant la libération des particules virales immatures hors de la cellule productrice (Bell and Lever, 2013). Sa délétion ou des mutations dans des domaines clés affectent la libération de particules virales de la membrane cellulaire et empêchent la finalisation du bourgeonnement, illustré par des virus immatures retenus à la membrane plasmique (Gottlinger et al., 1991; Huang et al., 1995). Les deux domaines dits « tardifs » de la protéine p6, « PTAP » et « LYPLTSL », qui lient respectivement les protéines cellulaires Tsg101 et ALIX requises pour le bourgeonnement (Rose et al., 2020). Les deux doigts de zinc de la NC permettent également le recrutement des protéines Tsg101 dans le cytoplasme avant leur transfert à la MP et augmentent l'affinité de liaison avec le domaine p6 (Chamontin et al., 2015; El Meshri et al., 2018). Enfin, p6 interagit avec la protéine accessoire Vpr pour permettre son incorporation dans les particules virales (Bachand et al., 1999; Fritz et al., 2010).

Il a été montré par RMN que p6 en association avec p1 se replierait partiellement sur la NCp7, ce qui modifierait la thermodynamique de la NC et favoriserait les liaisons non-spécifiques sur l'ARNg (Mouhand et al., 2018). Le domaine p6 semble également posséder un rôle dans l'oligomérisation de Gag et les interactions Gag/ARNg durant l'assemblage (Dubois et al., 2018; Tanwar et al., 2017).

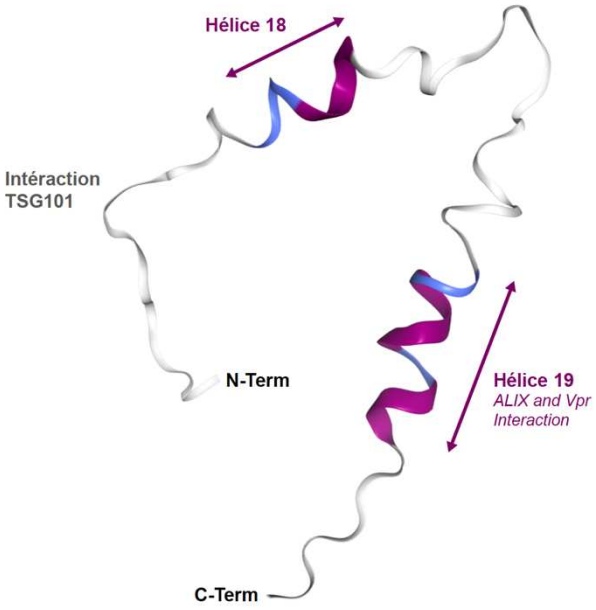


Figure 24 : Structure tridimensionnelle du domaine p6 du VIH-1.
Représentation tridimensionnelle du domaine p6 comportant deux hélices alpha. L'hélice 18 est adjacente au domaine N-terminal de p6 et inclue le site d'interaction avec TSG101. L'hélice 19 en C-terminal contient les domaines d'interaction avec Alix et d'incorporation de Vpr (PDB: 2C55) (Illustration de Gonzales, 2019).

2. Structure détaillée de la région 5' non-traduite de l'ARN génomique

Plus de vingt structures secondaires différentes ont été définies pour la région 5' non-traduite (5' UTR) de l'ARNg depuis plus de trente ans. Le modèle actuellement favorisé pour cette région consiste en un enchainement de structures en tiges-boucles séparées par une courte séquence de nucléotides (Lu et al., 2011). De 5' en 3' sont retrouvées les séquences TAR, Poly(A), PBS, SL1, SL2, SL3 et SL4 (Figure 25).

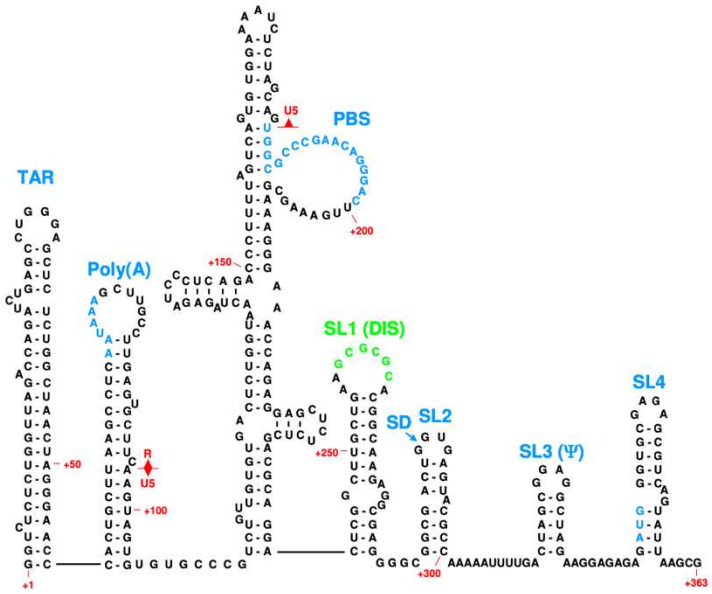


Figure 25 : Structure secondaire de la région 5'UTR de l'ARNg du VIH-1.
Représentation des différentes structures en tiges-boucles importantes pour la réplication du VIH-1 : l'élément TAR, la boucle poly(A), la boucle PBS et les tiges-boucles de 1 à 4 contenants les éléments DIS, le site donneur d'épissage majeur, le signal d'encapsidation et le codon start *gag*. Les nucléotides et la numérotation correspondent à la séquence HXB2 du VIH-1. (D'après Russell et al., 2004)

2.1. Le motif TAR

La première séquence retrouvée dans le 5'UTR est la région de *trans* activation TAR composée de 57 nt (Damgaard et al., 2004; Wilkinson et al., 2008). TAR est retrouvé dans la région 5' de tous les ARNm viraux épissés et non épissés. Cette région est le site de fixation de la protéine virale Tat qui permet une activation plus efficace de la transcription virale (voir parties 7.2.4 et 8.2.1) (Bannwarth and Gatignol, 2005; Brady and Kashanchi, 2005). TAR serait importante dans la stabilisation de l'ARNg ce qui expliquerait son rôle probablement indirect dans la dimérisation (Andersen et al., 2004; Damgaard et al., 2004), le transfert de brins pendant la transcription inverse (Berkhout et al., 2001; Harrich et al., 2000) et l'encapsidation du génome viral (Das et al., 1998; Harrich et al., 2000; Helga-Maria et al., 1999).

2.2. Le motif Poly(A)

La séquence Poly(A) contient le signal de polyadénylation AAUAAA (Lu et al., 2011; Berkhout et al., 1995). Des mutations perturbant l'appariement de base de Poly(A) affecterait l'encapsidation du génome ainsi que la réplication virale par une diminution des niveaux intracellulaires de l'ARNg, expliquant en partie la diminution de l'encapsidation du génome (Das et al., 1999) (Clever et al., 1999; Das et al., 1999, 1997). L'hypothèse de la formation d'appariements de bases entre des résidus de la

séquence de Poly(A) et la séquence DIS a été émise et serait responsable de la conformation LDI (voir partie 2.4) (Abbink et al., 2005).

2.3. Le motif PBS

Le PBS est le site de liaison pour l'amorce $ARNt^{Lys3}$ impliqué dans l'initiation de la transcription (voir partie 8.1.2) (Beerens and Berkhout, 2002; Goldschmidt et al., 2002; Isel et al., 1996; Zhang et al., 1998). Plusieurs modèles ont été proposés pour la structure secondaire de PBS avec de nombreuses variations dans les boucles supérieures et inférieures (Lu et al., 2011). Cependant, une séquence riche en A est présente dans la boucle interne de la partie supérieure de PBS et est conservée dans tous les sous-types majeurs du VIH-1 (Damgaard et al., 2004). Les études menées s'accordent néanmoins sur la présence d'une hélice PBS2 au centre de ce domaine. Enfin, de nombreuses études indiquent que PBS participerait à l'encapsidation de l'ARNg (Clever et al., 2002; Lu et al., 2011).

2.4. La tige-boucle SL1

La tige-boucle SL1 contient une séquence palindromique fortement conservée de six nucléotides riches en GC au niveau de la boucle apicale de SL1 nommée le signal d'initialisation de la dimérisation ou DIS (*Dimer Initiation Signal*) (Paillart et al., 1994; Skripkin et al., 1994). Chez les sous-types B du VIH-1, la séquence est de type GCGCGC tandis que chez les sous-types A, C et G la séquence est GUGCAC. Ce signal est capable à lui seul d'assurer la dimérisation des ARN *in vitro* et cette dimérisation semble être le prérequis pour une encapsidation spécifique de l'ARNg dans les particules virales (J. Chen et al., 2009; Houzet et al., 2007; Laughrea and Jetté, 1996; McBride and Panganiban, 1997; Moore et al., 2007; Mougel and Barklis, 1997; J. C. Paillart et al., 1996). Des mutations perturbant la structure de DIS ou la délétion complète de DIS inhibent la dimérisation de l'ARNg et provoquent une diminution de l'encapsidation du génome. Par ailleurs, cette dimérisation aurait un effet lors de la transcription inverse et lors de la traduction (Berkhout and van Wamel, 1996; Clever and Parslow, 1997; Kharytonchyk et al., 2016; Laughrea et al., 1999; McBride and Panganiban, 1996; Paillart et al., 1996). Enfin, plus récemment, il a été montré que SL1 contenait le site primaire de fixation de Gag à l'ARNg, au niveau de la boucle interne et de la partie basse de SL1 (Abd El-Wahab et al., 2014; Bernacchi et al., 2017).

2.5. La tige-boucle SL2

La tige boucle SL2 contient le site d'épissage majeur ou SD (*Splice Donnor*) localisé dans la boucle GGUG (Purcell and Martin, 1993). Ce domaine pourrait permettre une sélection potentielle spécifique de l'ARNg pour l'encapsidation étant donné que les ARN viraux épissés ne possèdent pas une partie

de la séquence Psi. Cependant, des mutations induites dans la partie basse de la boucle SD et perturbant l'appariement de base n'ont aucun effet sur l'encapsidation ou la réplication, ce qui suggère que ce domaine ne joue pas un rôle clé dans l'encapsidation du génome (McBride et al., 1997; McBride and Panganiban, 1996). La boucle SD isolée est capable de se lier avec la NC à haute affinité (Amarasinghe et al., 2000).

2.6. La tige-boucle SL3

La tige-boucle SL3, aussi appelée Psi est la région la plus conservée du 5'UTR et joue un rôle important dans l'encapsidation du génome (De Guzman, 1998; Lever et al., 1989). Une étude a démontré qu'un fragment du génome contenant SL3 est capable d'assurer l'encapsidation d'ARN hétérologues dans des VLP (Hayashi et al., 1993). Une autre équipe a mis en avant que SL3 ainsi que les séquences GA présentes en aval étaient nécessaires pour l'encapsidation ainsi que pour la dimérisation du génome viral (Russell et al., 2003). Les ARN contenant SL3 se lient au domaine NC avec une forte affinité (Athavale et al., 2010; Clever et al., 1995; De Guzman, 1998). En effet, les guanines G7 et G8 de la tétraboucle GGAG de SL3 s'insèrent profondément dans les poches hydrophobes de ZF1 et ZF2, formant ainsi des ponts hydrogènes entre le squelette NH des AN et les groupements carboxyles de la NC (De Guzman, 1998; South and Summers, 1993; Spriggs et al., 2008). La délétion complète de SL3 ou des mutations impactant les appariements de bases présents dans cette boucle réduisent fortement l'encapsidation de l'ARNg (Clever and Parslow, 1997; Lever et al., 1989; Luban and Goff, 1994; McBride and Panganiban, 1996; Russell et al., 2003), tandis que des mutations restaurant les appariements de bases de la tige-boucle restaurent complètement l'encapsidation (Clever and Parslow, 1997).

2.7. La tige-boucle SL4

La tige-boucle SL4 contient le codon start AUG du gène *gag* et plusieurs structures secondaires ont été proposées pour ce domaine (McBride et al., 1997; Nikolaitchik et al., 2006; Song et al., 2008). Un rôle de contribution aux interactions ARN/ARN a été proposé pour cette tige boucle par la stabilisation la structure tertiaire de Psi (Amarasinghe et al., 2001). La structure tridimensionnelle de cette tige-boucle a été résolue par RMN, illustrant la présence d'une tige instable et une tétraboucle GNRA stable (N : toute base ; R : G ou A) (Abraham and Fackler, 2012; Jucker et al., 1996).

3. Dimérisation de l'ARN génomique

La dimérisation résulte d'un appariement de bases non-covalent de type « kissing-loop » entre les séquences DIS homologues de SL1 (Figure 25) (Clever et al., 1996; Haddrick et al., 1996; Muriaux et

al., 1996, 1995; Paillart et al., 1996; Paillart et al., 1994; Skripkin et al., 1994; Weixlbaumer, 2004). Toute mutation affectant l'appariement de base entre les séquences DIS inhibe la dimérisation de l'ARNg, tandis que l'introduction de mutations compensatrices restaure ce processus (Clever et al., 1996; Paillart et al., 1996; Paillart et al., 1997, 1994; Skripkin et al., 1996). Un appariement de base étendu stabilise ensuite le dimère d'ARNg (Ennifar et al., 2007; Keane et al., 2016; van Bel et al., 2014). Des études de RMN et de cristallographie à rayons X ont décrit la structure tridimensionnelle des complexes « kissing-loop » et la conformation étendue de DIS (Figure 25 B). Ces études se sont basées sur les ARN 23-mer qui correspondent à la boucle apicale de DIS (Ennifar et al., 1999; Ennifar et al., 2001 ; Girard et al., 1999 ; Mujeeb et al., 1998). Le processus de dimérisation des ARN viraux est facilité grâce à l'activité chaperonne de la NC (Darlix et al., 1995; Feng et al., 1996; Jalalirad and Laughrea, 2010; Muriaux et al., 1996; Rein, 2010). Des mutations de la NC induisent une inhibition conséquente de la dimérisation (de Rocquigny et al., 2014; de Rocquigny et al., 1992; Kafaie et al., 2008). Dans ce contexte, plusieurs groupes ont montré que Gag pouvait recruter des protéines cellulaires pour faciliter cette activité de chaperonne des AN (Karnib et al., 2020; Mekdad et al., 2016; Xing et al., 2011). Le processus de dimérisation et de stabilisation du dimère est également étroitement lié aux étapes d'assemblage et de maturation virale (Ohishi et al., 2011). La dimérisation de l'ARNg possède un impact favorable sur la liaison à Gag (Bernacchi et al., 2017)

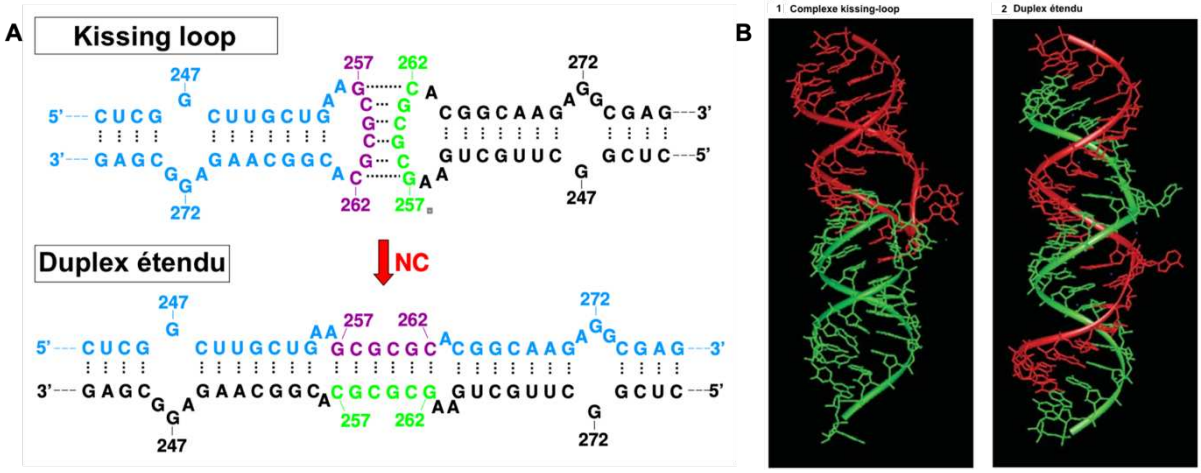


Figure 26 : Mécanisme de dimérisation de l'ARNg du VIH-1 et structure tridimensionnelle du dimère.
A) La dimérisation du génome viral est initiée par des appariements de bases selon Watson-Crick entre deux séquences palindromiques présentes dans la boucle de SL1 des deux ARNg monomériques (Le premier ARN est en bleu avec sa séquence DIS en mauve et le second ARN est en noir et sa séquence DIS en vert). Cette interaction forme un complexe "kissing-loop" instable. En parallèle de la maturation virale, le dimère instable est réarrangé pour former un duplex étendu plus stable qui implique un mécanisme dans lequel les bases appariées de la tige de SL1 se réarrangent de nouveau à leurs séquences complémentaires sur le brin opposé. Les nucléotides et la numérotation correspondent à la séquence HXB2 du VIH-1. B) Structure cristallographique obtenue par rayons X du complexe kissing-loop et du duplex étendu de l'ARN 23-mer (Isolat du sous-type A). Les deux brins ARN sont représentés en rouge et en vert. (NDB ID UR005 and UR0016). (D'après Paillart et al., 2004 et Russell et al., 2004)

La plupart des virions formés à partir de cellules co-infectées sont hétérozygotes, ce qui indique la dimérisation se produirait avant l'encapsidation de l'ARNg (Moore et al., 2007). La dimérisation des ARNg se produit dans le cytoplasme cellulaire, après leur export nucléaire (Ferrer et al., 2016; Moore et al., 2009; Onafuwa et al., 2003; Rhodes et al., 2003). Des ARN utilisant des voies d'export nucléaire différentes (CRM-1 ou NXF1) sont capables d'être co-encapsidés, mais moins efficacement que deux ARN provenant de la même voie, suggérant que la sélection des ARN se produit toujours dans le cytoplasme où les ARN sont déjà présents dans des locus précis (Moore et al., 2009). Des dimères d'ARNg sont ensuite détectés à la MP en présence de la protéine Gag (Chen et al., 2016). Néanmoins, la présence de deux signaux de dimérisation sur un seul ARN viral résulte en l'encapsidation d'un ARN monomérique (Sakuragi et al., 2001).

4. Conformations du 5'UTR

L'ARNg possède deux fonctions : il est encapsidé dans les particules virales immatures mais est aussi utilisé comme ARNm pour former les protéines Gag et Gag-Pol (Butsch and Boris-Lawrie, 2000; Dorman and Lever, 2000). L'équilibre entre la traduction et l'encapsidation d'un même ARN reste encore mal défini. Plusieurs études avancent des modèles où plusieurs conformations de l'ARNg viral existent, chacune ayant un rôle défini dans les processus précédemment cités (Kuzembayeva et al., 2014; Lu et al., 2011).

Le groupe de Berkhout a proposé deux conformations alternatives du 5'UTR de l'ARNg : la conformation LDI (*Long Distance Interaction*) favorisant la traduction de l'ARN et la conformation BMH (*Branched Multiple Hairpain*) favorisant l'encapsidation et la dimérisation (Figure 27 A). Dans la conformation LDI, la structure DIS participe à une interaction longue distance avec le domaine en amont de PolyA et de ce fait empêche la formation du « kissing loop » permettant la dimérisation de l'ARNg. Dans la conformation BMH, les séquences DIS sont exposées, permettant ainsi la dimérisation et l'encapsidation de l'ARNg. La NC pourrait perturber la conformation LDI pour favoriser la dimérisation de l'ARN *in vitro*. Néanmoins, l'existence de ces conformations restent à démontrer *in vivo* (Berkhout et al., 2001).

Plus récemment, le groupe de Summers a également proposé deux conformations de la région 5'UTR de l'ARNg (Figure 27 B). La conformation favorisant la traduction séquestrerait la séquence DIS via une interaction avec U5 et non avec Poly(A), tandis que le codon AUG de SL4 participerait à des appariements de base dans tige de SL4. Dans la conformation favorisant la dimérisation et l'encapsidation, la séquence AUG se lierait avec U5, permettant ainsi l'exposition de la séquence DIS. Ce modèle est très attirant, mais des données le confirmant *in vivo* sont indisponibles.

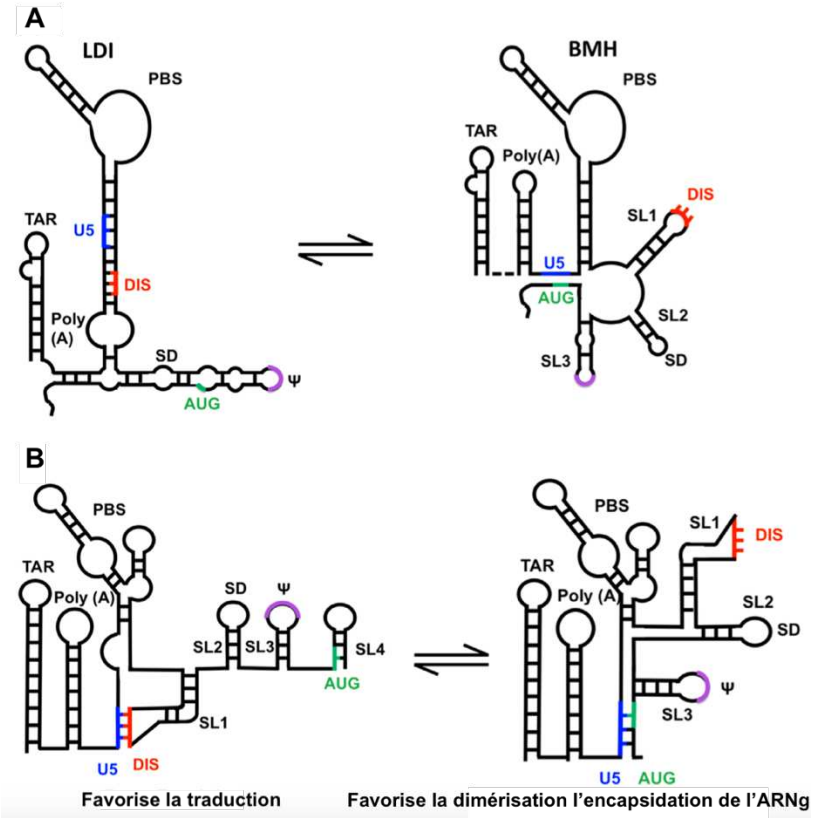


Figure 27 : Modèles des structures secondaires du 5'UTR de l'ARNg du VIH-1 favorisant la traduction du génome (à gauche) ou la dimérisation et l'encapsidation du génome (à droite).
A) Conformations du 5'UTR proposées par le groupe de Berkhout. Dans la conformation LDI, la séquence DIS est séquestrée via des interactions avec la région poly(A). Dans la conformation BMH, le codon AUG de *gag* se lie à la séquence U5, permettant l'exposition de la séquence DIS. (Abbink and Berkhout, 2003) B) Conformations du 5'UTR proposées par le groupe de Summers. Dans la conformation favorisant la traduction, la séquence DIS est liée avec la région U5 et le codon start de *gag* est exposé. Dans la conformation favorisant la dimérisation et l'encapsidation, l'AUG interagit avec la région U5, permettant l'exposition de la séquence DIS (Lu et al., 2011). Codon AUG de *gag* (vert), DIS (rouge), U5 (bleu), Psi (ψ) (violet) (D'après Kuzembayeva et al., 2014).

5. Traffic de l'ARNg

L'ARNg est exporté hors du noyau grâce à la protéine virale Rev (Fornerod et al., 1997; Neville et al., 1997). La voie de transport utilisée (CRM-1 ou NXF1) a un effet majeur sur la capacité de ces derniers à être co-encapsidés (Moore et al., 2009) et peut influencer la fonction des protéines qu'il code et bloquer l'assemblage (Sherer et al., 2009; Swanson et al., 2004). Les mécanismes permettant le transport de l'ARNg du VIH-1 au travers de la cellule jusqu'au site d'assemblage sont mal compris. La plupart des ARNg traffiquent par diffusion dans le cytosol, de façon non-directionnelle et ne nécessitent pas la présence du cytosquelette (Chen et al., 2014). Les ARN des rétrovirus pourrait également être transportés dans des vésicules endosomales positives au marqueur Rab11 avec les protéines Gag et Env (Basyuk et al., 2003; Swanson and Malim, 2006). Lorsque la protéine Gag est

présente, la diffusion des ARN viraux est modifiée puisqu'ils restent plus longtemps proches de la MP et leurs mouvements latéraux sont diminués (Chen et al., 2014; Jouvenet et al., 2009; Sardo et al., 2015). Il a également été observé que la délétion de l'un des doigts de zinc de la NC retarde la délivrance de l'ARNg à la MP, mais n'empêche pas sa liaison avec Gag (Boutant et al., 2020). Enfin, le groupe de Mouland a émis l'hypothèse que l'ARNg est transporté sous forme de complexes avec Gag et la protéine cellulaire Stau1 durant l'assemblage viral (Milev et al., 2010; Mouland et al., 2000), en s'appropriant les granules de stress (Rao et al., 2019).

6. Mécanisme détaillé de l'assemblage du VIH-1

L'assemblage du VIH-1 est un processus réalisé en plusieurs étapes indépendantes mais réalisées parallèlement et permettant aux différents composants viraux de s'associer par des interactions entre les protéines virales, les acides nucléiques et les lipides de la membrane cellulaire. La protéine Gag, seule protéine virale capable de s'assembler en VLP, orchestre finement les trois étapes conjointes de l'assemblage : l'oligomérisation de Gag, l'encapsidation de l'ARNg et la liaison de Gag à la MP (Figure 28).

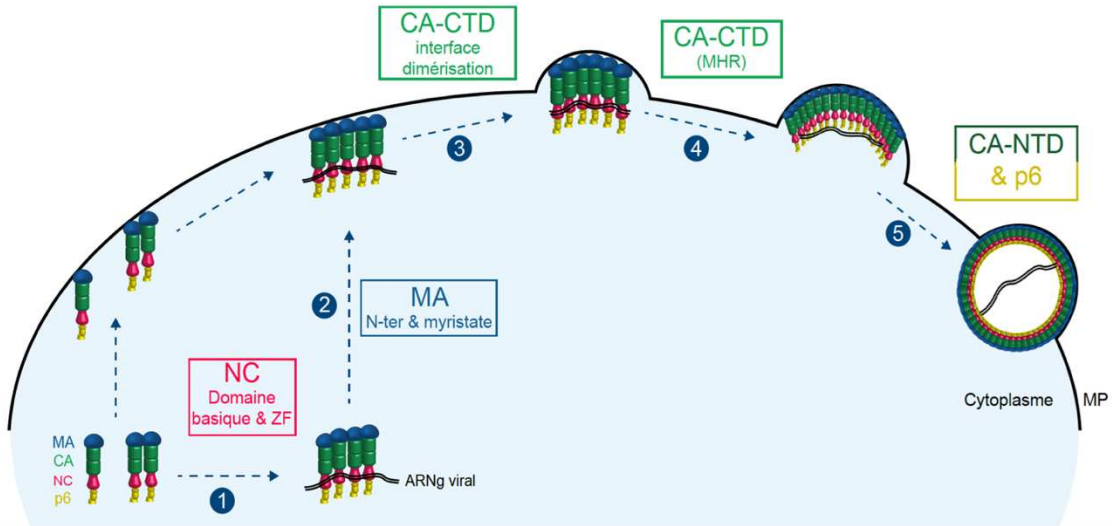


Figure 28 : Représentation des étapes successives de la multimérisation de Gag durant l'assemblage viral et implication des différents domaines.

La synthèse du précurseur Gag dans le cytoplasme signe l'initiation de l'assemblage viral. Les protéines Gag principalement monomériques ou dimériques rejoignent la MP, conjointement à leur multimérisation grâce au recrutement de l'ARNg par le domaine NC, qui participe à l'oligomérisation Gag en servant plateforme d'assemblage (1). Les oligomères de bas ordre moléculaire sont adressés au feuillet interne de la MP, via le domaine N-terminal de MA et l'ancrage du myristate, où elles poursuivent leur multimérisation en recrutant des monomères et des dimères de Gag présents le long de la MP (2). Le domaine CA de Gag assure ensuite une multimérisation continue de ces complexes via l'interface de dimérisation de la région CTD (3), puis via la région MHR (4) pour aboutir à des complexes Gag multimérisés de haut ordre moléculaire. La formation du bourgeon viral est achevée par la partie NTD de CA et le peptide SP1 (5) puis la libération du virus immature est assurée par le recrutement des facteurs cellulaires ESCRT par le domaine p6. (Illustration de Gonzales, 2019, Adapté de Robinson et al., 2014).

Il a été décrit qu'un virion mettrait en moyenne de trois (Bednarska et al., 2020) à huit minutes pour s'assembler (Ivanchenko et al., 2009).

6.1. Oligomérisation de Gag

Gag est synthétisée par les ribosomes dans le cytosol, à partir des ARNm non-épissés puis est principalement retrouvée dans le cytoplasme sous forme de monomères ou d'oligomères de petite taille (Chen et al., 2009; Hendrix et al., 2015). Cette oligomérisation de Gag se fait grâce à des contacts intermoléculaires impliquant la région MHR de la capside (Hogue et al., 2009; Mammano et al., 1994; von Schwedler et al., 2003). Gag s'oligomérise dans le cytoplasme cellulaire au cours de son export en direction de la MP (El Meshri et al., 2015; Kutluay and Bieniasz, 2010), lieu d'assemblage majeur. De nombreuses études, notamment de microscopie optique sur cellules vivantes, ont permis d'apporter des précisions sur la dynamique du traffic intracellulaire de Gag et son adressage au site d'assemblage. Le modèle actuellement favorisé stipule que des dimères de Gag s'associent aux AN dans le cytoplasme, puis Gag s'oligomérise au fur et à mesure de son transport vers la MP (El Meshri et al., 2015). Une fois présents au site d'assemblage, les oligomères de Gag initient une multimérisation de haut ordre moléculaire en recrutant des molécules additionnelles de Gag qui sont déjà présentes ou qui proviennent du cytoplasme (Hendrix et al., 2015; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009). L'accumulation de multimères de Gag à la MP est essentielle à la formation de bourgeons viraux qui donneront naissance à des particules virales (Derdowski et al., 2004; Hogue et al., 2009; Hübner et al., 2007; Larson et al., 2003; Li et al., 2007). Plusieurs études ont détecté Gag dans la cellule sous forme d'un signal diffus entre 5 et 6 h après la transfection et sous forme ponctiforme à la MP à partir de 6 à 7 h après la transfection (Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2008).

L'oligomérisation de Gag fait également intervenir d'autres domaines de Gag tels que SP1 et NC. Les doigts de zinc du domaine NC sont requis pour la formation d'oligomères de Gag et pour la distribution spatio-temporelle de Gag dans les cellules (El Meshri et al., 2015). En effet, la délétion complète de la NC ou des doigts de zinc perturbe l'oligomérisation de Gag et son traffic vers la MP, provoquant une accumulation intracellulaire de Gag et un effet négatif sur la biogénèse du virion et sa maturation (El Meshri et al., 2015; Grigorov et al., 2007; Larson et al., 2003). La mutation des résidus basiques de la NC provoque le même effet délétère, suggérant que plusieurs résidus du domaine NC sont impliqués dans l'oligomérisation de Gag (Chukkapalli et al., 2010; Cimarelli and Luban, 2000; Datta et al., 2011; Jones et al., 2011; Poon et al., 1996).

Gag s'associe avec de nombreux facteurs cellulaires durant son traffic cellulaire (Klingler et al., 2020). C'est notamment le cas de la protéine cellulaire ABCE1, qui aiderait à la multimérisation de Gag grâce à une liaison directe avec le domaine NC (Dooher et al., 2007; Lingappa et al., 2006) et de l'hélicase

DDX6 qui faciliterait l'assemblage de Gag pour catalyser l'assemblage de la capside virale (Reed et al., 2012). Plusieurs études ont mis en avant l'implication du cytosquelette de la cellule hôte (microtubules et filaments d'actine) dans le transport de Gag vers le site d'assemblage (Rey et al., 1996). Les kinésines et les dynéines, protéines motrices des microtubules assurant l'acheminement des cargos intracellulaires vers la membrane, semblent se lier à Gag et être impliquées dans son transport intracellulaire (Lehmann et al., 2009; Martinez et al., 2008). Concernant l'actine, aucun consensus n'est actuellement adopté. Il a été montré que l'actine filamenteuse interagirait directement avec le domaine NC de Gag et serait incorporée dans les virions (Liu et al., 1999; Ibarrondo et *al*., 2001) et sa dépolymérisation bloquerait partiellement le bourgeonnement viral et inhiberait la présence de virions au niveau de la MP des lymphocytes (Jolly et al., 2007; Sasaki et al., 2004). Inversement, une autre équipe montre que sa polymérisation ne serait pas indispensable au transport et à l'assemblage du VIH-1 (Rahman et al., 2014). Le transport de Gag à la MP serait également facilité par des facteurs cellulaires impliqués dans le trafic des vésicules intracellulaires tels que les complexes de protéines adaptatrices hétérotétrameriques (AP) associées à la clathrine ou les protéines du facteur de ribosylation de l'ADP (Arf) (Balasubramaniam and Freed, 2011; Camus et al., 2007). En effet, la déplétion des protéines Arf endogènes entraine un défaut d'adressage de Gag à la MP (Joshi et al., 2008).

6.2. Liaison de Gag aux acides nucléiques

6.2.1. Encapsidation préférentielle de l'ARNg

De façon concomitante à son oligomérisation, quelques oligomères de Gag se condensent sur l'ARN viral (ou cellulaire) (Figure 29) (Boutant et al., 2020; Hendrix et al., 2015; Kutluay and Bieniasz, 2010; Kuzembayeva et al., 2014; Lu et al., 2011; Ott et al., 2009; Rein et al., 2011). Gag sélectionne et recrute spécifiquement un dimère d'ARN génomique viral non-épissé parmi les ARNm viraux épissés et cellulaires présents en large excès dans le cytosol (Chen et al., 2009; Didierlaurent et al., 2011; Lu et al., 2011; Nikolaitchik et al., 2013). L'ARNg du VIH-1 représente une partie variable de l'ARN encapsidé dans les virions, pouvant aller de 30 % à 90% de la masse totale des ARN (Chen et al., 2009; Sardo et al., 2015). Une étude a mis en évidence une colocalisation précoce de Gag avec l'ARNg dans la région périnucléolaire et au niveau de centrioles (Poole et al., 2005). De façon intéressante, quelques études soulignent également la présence d'oligomères Gag-ARNg du VIH-1 dans le noyau cellulaire (Stake et al., 2013; Tuffy et al., 2020), comme cela est le cas pour d'autres rétrovirus tels que RSV (Garbitt-Hirst et al., 2009; Stake et al., 2013). Cependant, seuls les travaux de l'équipe de Parent mettent en avant la localisation nucléaire de ces complexes, ce qui n'est pas le cas d'autres études (Grewe et al., 2012).

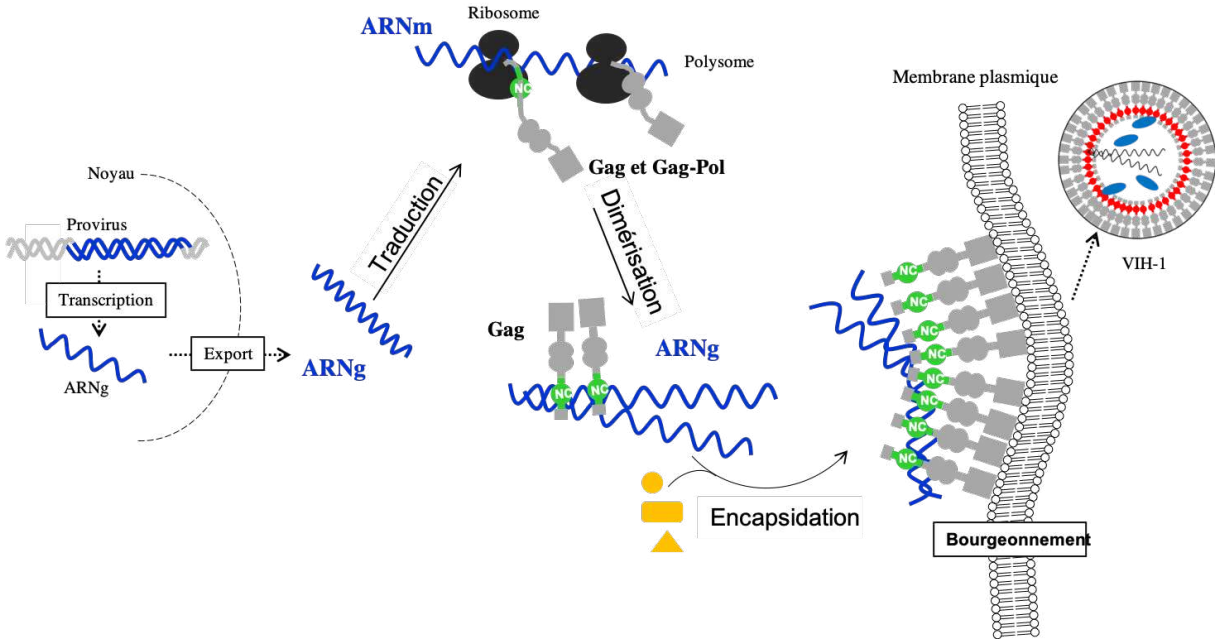


Figure 29 : Représentation simplifiée de l'assemblage du VIH-1 induit par l'interaction entre la protéine Gag et l'ARN génomique.
Le provirus intégré de façon stable dans le génome de la cellule hôte est transcrit en différents ARNm viraux, dont l'ARN génomique. Ce dernier est exporté hors du noyau et puis est soit traduit en protéines virales (Gag et Gag-Pol) par les ribosomes, soit encapsidé dans les virions naissants. L'ARNg sous forme d'un dimère s'associe avec un dimère de protéines Gag dans le cytoplasme. Ces oligomères sont ensuite ciblés en direction de la membrane plasmique où des monomères additionnels de Gag sont recrutés pour former des multimères de haut poids moléculaire aboutissant à la formation d'un bourgeon viral qui donnera naissance à une particule virale immature.

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer la façon dont Gag sélectionne spécifiquement l'ARNg viral. D'une part Gag interagirait avec des sites de haute affinité présents dans le domaine Psi (Darlix et al., 1990; Abd El-Wahab et al., 2014; Clever et al., 1995; De Guzman, 1998; Ding et al., 2020; Lever et al., 1989; Sakaguchi et al., 1993) et dans le RRE (Grewe et al., 2012; Kharytonchyk et al., 2018). Gag se lierait spécifiquement à des sites de haute affinité présents dans l'ARNg mais pas dans les ARN épissés (Bernacchi et al., 2017).

Un autre modèle serait que Gag se lierait avec des affinités similaires aux ARNg contenant ou non une séquence Psi (Comas-Garcia et al., 2017; Webb et al., 2013), mais que l'ARNg serait sélectivement encapsidé car il initie l'assemblage plus rapidement et plus efficacement que les autres types d'ARN (Comas-Garcia et al., 2017). Ces études d'assemblage *in vitro* ont démontré que l'ARN viral servirait de plateforme de nucléation pour une multimérisation plus efficace et plus rapide des protéines Gag permettant une liaison plus efficace qu'avec les ARNm cellulaires (Campbell and Rein, 1999;

Campbell and Vogt, 1995; Comas-Garcia et al., 2018, 2017, 2016; Dilley et al., 2017; Nikolaitchik et al., 2013).

Un modèle propose que l'initiation de la dimérisation de l'ARNg via la séquence Ψ expose ou augmente les sites d'interaction Gag-Gag et donc la concentration locale de ces protéines (Dilley et al., 2017). L'encapsidation de l'ARNg par Gag permet ainsi un assemblage plus efficace et spécifique que lors du recrutement des ARNm cellulaires. La délétion du domaine CTD de CA réduit la stabilité de l'interaction entre Gag et l'ARNg, suggérant que les interactions Gag-Gag participent également à la spécificité de recrutement du génome (Kutluay and Bieniasz, 2010). Les propriétés de liaison de Gag à l'ARNg varient drastiquement durant la genèse des virus, ce qui permet de réguler la formation de virions du VIH-1 tout en coïncidant avec la liaison de Gag à la MP, la multimérisation de Gag et la maturation virale. Avant l'assemblage et après la maturation, Gag se lie préférentiellement à la séquence d'encapsidation Psi et à la séquence RRE de l'ARNg ainsi qu'à des séquences ARNm riches en GU. Inversement, durant l'assemblage, le domaine NC se lie à plusieurs sites présents sur l'ARNg ainsi qu'à des séquences ARNm riches en A, afin de favoriser l'encapsidation du génome viral (Kutluay et al., 2014).

Gag est capable d'encapsider des ARN provenant de différentes voies d'export utilisées par l'ARNm (Moore et al., 2009). Une étude a démontré que Gag possède la capacité d'encapsider efficacement les ARN présents *en trans* (Nikolaitchik et al., 2006) mais il encapside préférentiellement l'ARN duquel il est issu (Poon et al., 2002). De plus, la localisation cellulaire de l'ARNg aide au confinement des interactions avec Gag et les facteurs cellulaires afin d'assurer une production virale à une localisation et dans une temporalité adéquate (Becker and Sherer, 2017).

Plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans le ciblage des protéines structurales et de l'ARNg du VIH-1 au site d'assemblage tels que les petites GTPases de la famille Rab ou Staufen, une protéine liant les ARN doubles brins et contribuant au transport des ARN dans les cellules de drosophiles et de mammifères. Staufen est sélectivement incorporée dans les virions pendant l'assemblage du VIH-1. Cette protéine a été détectée dans des complexes ribonucléoprotéiques de type granules de stress contenant l'ARNg du VIH-1 mais pas les ARN viraux épissés, indiquant que Staufen se lie spécifiquement aux séquences de l'ARNg et possède un rôle dans la sélection de l'ARNg et son transport (Abrahamyan et al., 2010; Chatel-Chaix et al., 2004; Mouland et al., 2000).

6.2.2. Domaines de Gag et de l'ARNg impliqués dans l'encapsidation

L'encapsidation de l'ARNg fait intervenir le domaine NC de Gag (Berkowitz et al., 1995; Dannull et al., 1994; Darlix et al., 2011; D'Souza and Summers, 2005; Mailler et al., 2016; Muriaux and Darlix,

2010; Sakaguchi et al., 1993). Le remplacement du domaine NC par un domaine leucine zipper permet d'assurer les interactions Gag-Gag et n'impacte par l'assemblage viral et le bourgeonnement, néanmoins les particules virales formées sont dépourvues d'ARNg (Accola et al., 2000; Zhang et al., 1998). Des mutations ponctuelles ou des délétions dans les doigts de zinc ou dans les régions basiques provoquent des défauts d'encapsidation du génome (Boutant et al., 2020; Cimarelli and Luban, 2000; Gorelick et al., 1988; Grigorov et al., 2007; Laughrea et al., 2001; Tanchou et al., 1998) parfois accompagné d'une augmentation du ratio d'ARN épissés sur les ARN non-épissés dans les particules virales (Bernacchi et al., 2017). De manière intéressante, ces études pointent une implication différentielle des doigts de zinc dans les différentes étapes du cycle viral. ZF1 possèderait un rôle plus essentiel dans la reconnaissance des AN (Gorelick et al., 1993; Schwartz et al., 1997) tandis que ZF2 serait plutôt impliqué dans l'assemblage viral et l'encapsidation de l'ARNg (Darlix et al., 2011; Mouhand et al., 2020). La délétion de l'un ou de l'autre des ZF retarde la délivrance de l'ARNg à la MP, mais n'empêche pas les interactions Gag-ARNg, soulignant le rôle redondant des doigts de zinc dans ce processus (Boutant et al., 2020).

Concernant l'ARNg, des efforts considérables ont été réalisés afin de mettre en évidence et de caractériser avec précision les séquences reconnues par Gag lors de l'encapsidation. La région 5'UTR de l'ARNg est le déterminant majeur de l'encapsidation. Des séquences allant de TAR et s'entendant jusqu'à l'extrémité 5' du gène *gag* semblent impliquées dans ce processus (Berkowitz et al., 1995; D'Souza and Summers, 2005; Luban and Goff, 1994; McBride et al., 1997), soulignant que l'encapsidation de l'ARNg n'implique pas une seule structure mais plutôt divers domaines dont le repliement spatial tiendrait un rôle non négligeable. La présence du « packaging signal » ou « Psi » ou encore « Core Encapsidation signal », une séquence de 100 à 200 nucléotides allant de PBS à la tige-boucle SL4, serait suffisante pour assurer la dimérisation de l'ARNg, la liaison de la NC *in vitro* et l'encapsidation sélective de l'ARNg (Heng et al., 2012; Keane et al., 2015). Cette région semble contenir deux douzaines de sites de liaison de la NC, avec des affinités variées (Ding et al., 2020).
Deux tiges-boucles du 5'UTR semblent contenir des sites d'affinité majeurs de la NC, responsables de l'encapsidation du génome : SL1 et SL3. La boucle interne et la région supérieure de SL1 contiennent le site primaire de liaison de Gag (Abd El-Wahab et al., 2014; Bernacchi et al., 2017; Houzet et al., 2007; Sakaguchi et al., 1993). Sa mutation réduit significativement l'encapsidation de l'ARNg (Didierlaurent et al., 2011; Harrison et al., 1998; McBride and Panganiban, 1996; Paillart et al., 1996). Un système de double régulation assurerait une liaison spécifique de Gag à l'ARNg malgré la présence de SL1 sur les ARNm viraux épissés. La région en amont de SL1, présente sur tous les ARN viraux, préviendrait la liaison de Gag à SL1 tandis que les séquences en aval de SL4, uniquement

présentes sur l'ARNg, contrebalancerait cette régulation négative (Abd El-Wahab et al., 2014). SL3 possède également un site de haute affinité pour la NC (De Guzman, 1998), soulignant son implication dans l'encapsidation. La mutation ou la délétion de SL3 diminue drastiquement la quantité d'ARNg encapsidé dans les virus (Aldovini and Young, 1990; Clavel and Orenstein, 1990; Clever and Parslow, 1997; Didierlaurent et al., 2011; Harrison et al., 1998; Lever et al., 1989; Luban and Goff, 1994; McBride and Panganiban, 1996; Russell et al., 2003). De plus, seule SL3 semble capable d'encapsider indépendamment des ARN hétérologues (Hayashi et al., 1992).

Cependant, d'autres séquences de l'ARNg semblent être impliquées dans le processus d'encapsidation de l'ARNg, telles que les régions TAR (Clever et al., 1999; Helga-Maria et al., 1999; McBride et al., 1997), poly(A) (Clever et al., 1999; Das et al., 1998), PBS (Clever et al., 2002), SL2 (Amarasinghe et al., 2000; Kim et al., 1994), SL4 (Amarasinghe et al., 2001; Luban and Goff, 1994; McBride and Panganiban, 1997; Nikolaitchik et al., 2006) et RRE (Brandt et al., 2007; Cockrell et al., 2011; Kutluay et al., 2014).

6.2.3. Encapsidation des ARN viraux épissés et cellulaires

En l'absence de l'ARNg contenant la séquence Psi, les virions peuvent incorporer des ARN épissés et des ARN cellulaires. Plusieurs études ont montré que des formes d'ARN viraux épissés sont incorporées de façon significative dans les virions et indépendamment de la voie d'export utilisée (Clever and Parslow, 1997; Houzet et al., 2007; Roy et al., 2006; Russell et al., 2004). Il a notamment été montré que la tige-boucle SL1 n'était pas indispensable dans l'encapsidation des ARN épissés (Houzet et al., 2007) mais que l'ARNg possédant une séquence d'encapsidation défectueuse peut néanmoins être encapsidé lorsqu'il est surexprimé dans la cellule, malgré une présence accrue des ARN épissés (Luban and Goff, 1994; Muriaux et al., 2001).

Le VIH-1 peut également incorporer dans ses particules virales des ARN cellulaires de façon non spécifique en présence de séquences d'encapsidation défectueuses (Muriaux et al., 2001; Rulli et al., 2007; Wang and Aldovini, 2002). C'est notamment le cas des ARNt, qui sont très enrichis dans les virions (Kutluay et al., 2014). D'autres espèces d'ARN cellulaires sont également retrouvés, tels que l'ARN 7SL, l'ARNsn U6 et l'ARNr 5S (Giles, 2004; Onafuwa-Nuga, 2006). En revanche, les virions n'encapsident pas d'ARN mitochondriaux, bien qu'ils soient très abondants dans la cellule, probablement à cause de leur compartimentalisation dans la mitochondrie ce qui les éloigne des zones d'assemblage virales dans les cellules (Rulli et al., 2007).

6.3. Assemblage de Gag à la membrane plasmique

Pour finaliser l'assemblage viral, les oligomères de Gag liés à ARNg sont rapidement acheminés à la MP, où ils s'accumulent au niveau de microdomaines spécifiques de type radeaux lipidiques et s'ancrent dans la MP au niveau de domaines riches en phospatidyl inositol (Chukkapalli and Ono, 2011; Lorizate and Krausslich, 2011; Ono et al., 2004; Rein et al., 2011; Saad et al., 2008) (Figure 26). Progressivement, les oligomères de Gag se multimérisent en recrutant des molécules de Gag additionnelles qui sont déjà présentes le long de la MP ou provenant du cytoplasme (Chen et al., 2016; Hendrix et al., 2015; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009). Dans la particule virale complète immature, environ 2500 copies de la protéine Gag s'assemblent autour de l'ARNg (Chen et al., 2009; Comas-Garcia et al., 2016; Kuzembayeva et al., 2014; Mailler et al., 2016; Sundquist and Krausslich, 2012).

Dans la majorité des cellules infectées par le VIH-1 telles que les lymphocytes T CD4 et les lignées cellulaires de laboratoire (HeLa, Cos7, HEK 293T…) l'assemblage se produit au niveau de la MP (Jouvenet et al., 2006). Cependant, plusieurs études ont décrit l'existence d'un assemblage et d'un bourgeonnement du VIH-1 dans des compartiments intracellulaires positifs pour les marqueurs des endosomes tardifs ou des MVB dans plusieurs types cellulaires (Dong et al., 2005; Kyere et al., 2012; Nydegger et al., 2003; Ono and Freed, 2004; Perlman and Resh, 2006). C'est notamment le cas des macrophages, cellules réservoir du VIH-1, où l'assemblage du virus semble se produire de façon prédominante dans ce type compartiments intracellulaires (Gousset et al., 2008; Inlora et al., 2016; Joshi et al., 2009; Jouve et al., 2007, 2007; Molle et al., 2009; Nguyen et al., 2003; Pelchen-Matthews et al., 2003; Raposo et al., 2002; Sherer et al., 2003). Ces compartiments intracellulaires ont longtemps été décrit comme étant des endosomes tardifs (ou des MVB) mais ont été plus récemment définis comme étant des IPMC (Deneka et al., 2007; Nkwe et al., 2016).

7. Régulation potentielle de l'assemblage du VIH-1 par les domaines NC et MA

Gag possède deux domaines NC et MA qui avec, leurs résidus basiques, peuvent interagir à la fois avec les AN et les lipides. Une hypothèse avancée dans la littérature propose que ces deux domaines basiques seraient importants pour la régulation de l'assemblage viral est la formation d'une conformation fermée de Gag dans le cytosol, aussi appelé le Gag « en U » (Datta et al., 2011; Munro et al., 2014; Parent and Gudleski, 2011). Ce modèle stipule que Gag serait retenu dans le cytoplasme dans une conformation repliée via l'interaction des domaines NC et MA avec l'ARNg en l'absence de membranes biologiques, permettant ainsi aux multimères de Gag d'être nucléés sur l'ARNg (Figure 30). La liaison de Gag au PI(4,5)P2 de la PM induirait une compétition avec l'ARNg pour la liaison au domaine MA, entrainant des changements conformationnels dans Gag et permettant l'ancrage du

myristate dans le feuillet interne de la PM et l'exposition de la région CA-SP1 nécessaire pour l'assemblage des particules virales immatures. La partie N-terminale de Gag s'ancre donc dans le feuillet interne de la bicouche lipidique tandis que le domaine C-terminal reste lié à l'ARNg via la NC (Rein et al., 2011). Les protéines Gag ne possédant pas le domaine MA conservent la capacité de lier spécifiquement à l'ARNg in vitro, tandis qu'une délétion des domaines MA et CA diminue à la fois l'affinité de fixation et la spécificité (Geigenmuller and Linial, 1996). La liaison de l'ARN au domaine MA pourrait aussi servir de régulateur pour éviter la liaison de MA à des membranes cellulaires inappropriées avant l'arrivée de Gag au site d'assemblage de la MP (Chukkapalli and Ono, 2011). Cependant, cette conformation en U n'a jamais été observée en milieu cellulaire.

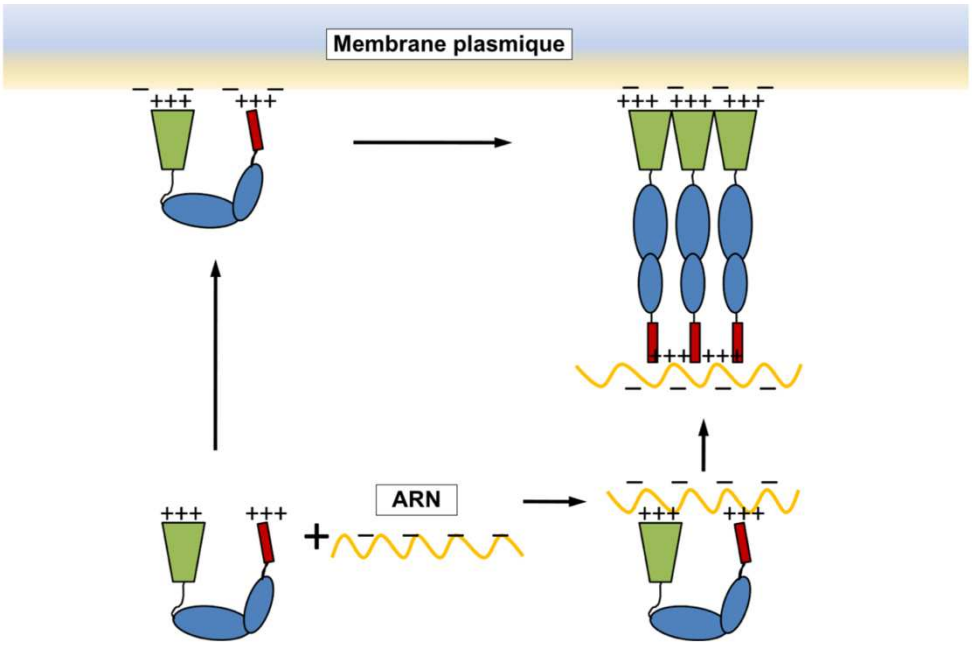


Figure 30 : Changements conformationnels de la protéine Gag du VIH-1 pendant l'assemblage viral.
(i) La protéine Gag est sous forme d'une conformation repliée en solution, avec ses deux extrémités rapprochées. Les domaines MA en N-terminal (en vert) et NC en C-terminal (en rouge) sont chargés positivement. Le domaine MA possède une plus grande affinité pour les phospholipides chargés négativement que pour l'ARN, tandis que le domaine NC possède l'affinité inverse. Des interactions électrostatiques non-spécifiques maintiennent la conformation compacte de Gag lorsque la protéine est liée à la MP (ii) ou à un ARN (iv). (iii) Cependant, quand les deux types de ligands sont présents, la protéine s'étend en une conformation étendue présente dans les particules virales. (D'après Rein et al., 2011)

OBJECTIFS

De nombreuses équipes ont étudié l'association entre la protéine Gag et l'ARN génomique du VIH-1. Il a notamment été montré par microscopie optique que Gag et l'ARNg sont co-localisés dans le cytoplasme des cellules (Chen et al., 2014; Ferrer et al., 2016; Grigorov et al., 2006; Kemler et al., 2010; Molle et al., 2009; Perlman and Resh, 2006) mais également au niveau de la membrane plasmique (Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009). Des techniques biochimiques ont également détecté des complexes Gag-ARNg dans le cytoplasme (Kutluay et al., 2014; Kutluay and Bieniasz, 2010). Grâce à des approches de microscopie quantitative en milieu cellulaire (FLIM, FRET et FCS), plusieurs équipes ont quantifié l'interaction entre Gag et l'ARNg (Boutant et al., 2020; Hendrix et al., 2015). Des chercheurs ont notamment montré sans ambiguïté que cette interaction était initiée dans le cytoplasme de la cellule et que la délétion des deux motifs dactyles liant le zinc du domaine NC de Gag se traduisait par une perte du complexe Gag-ARNg (Boutant et al., 2020).

Ces travaux réalisés par microscopie optique ne permettent en revanche pas de déterminer l'ultrastructure cellulaire entourant les complexes Gag-ARNg, notamment s'ils sont proches d'une membrane cytoplasmique ou intracellulaire. Par ailleurs, nous ne sommes pas en capacité de savoir si ces complexes sont encapsidés dans une particule virale qui a bourgeonné ou qui est en cours de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont eu pour objectif de détecter et de visualiser la formation des complexes Gag-ARNg à haute résolution et en fonction du temps par Microscopie Électronique à Transmission (MET). Cette technique possède une résolution inférieure à 5 nm permettant de répondre à la question de la nature de l'environnement cellulaire abritant les complexes Gag-ARNg. Pour cela, deux approches de microscopie à haute résolution ont été évaluées :

- Les immunomarquages avec des nanoparticules d'or suite à une préparation des échantillons par la technique Tokuyasu pour la MET. Cette méthode a été couplée à une analyse morphométrique des complexes Gag-ARNg.
- La microscopie corrélative associant la microscopie confocale et la MET.

Les résultats décrits dans la suite de ce manuscrit ont fait l'objet d'une soumission dans la revue *Journal of Biochemical Chemistry* pour publication, présenté en annexe 1. Le manuscrit est actuellement en cours de révision.

MATERIEL ET MÉTHODES

1. Plasmides

Le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv a été fourni par Marylène Mougel de l'IRIM à Montpellier (Ferrer et al., 2016). Il permet la synthèse de l'ARNg viral du clone NL4.3 du VIH-1 et contient les séquences 5' et 3' non-traduites (LTR) ainsi que les gènes *gag*, *nef*, *vpu*, *vif*, *vpr*, *tat* et *rev*. Cette construction contient 24 répétitions des tiges-boucles MS2 insérées dans le gène *pol* (nucléotides 2619-4551). Enfin, ce plasmide est délété du gène *env* (nucléotides 7031-7611), permettant sa manipulation en laboratoire de sécurité de niveau 2. Les plasmides pNL4.3-ΔZF1ΔZF2-MS2-Δenv et pNL4.3-ΔSL1-MS2-Δenv ont également été obtenus par Marylène Mougel. Les plasmides mutants pNL4.3-ΔNC-MS2-Δenv, pNL4.3-F16A-MS2-Δenv, pNL4.3-W37A-MS2-Δenv, pNL4.3-F16AW37A-MS2-Δenv, pNL4.3-H23C-MS2-Δenv, pNL4.3-H44C-MS2-Δenv, pNL4.3-H23CH44C-MS2-Δenv, pNL4.3-G2A-MS2-Δenv, pNL4.3-Δp6-MS2-Δenv, pNL4.3-ΔSL1ΔSL3-MS2-Δenv ont été construits au laboratoire par PCR et mutagenèse dirigée. Le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv étant d'une taille de 13 857 pb avec les deux LTR et une série de tiges boucles MS2, les mutations étaient introduites grâce à un système de cassette pCDNA3.1 (+) où le gène *gag* est inclus, ce qui facilite la PCR et permet une amplification des bactéries à 37°C. Une fois la mutation introduite, le gène gag muté est réintroduit grâce aux enzymes de restriction BssHII et BstBI dans le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv, qui est amplifié dans des bactéries chimiocompétentes Stbl3 à 30°c. Le plasmide pNL4.3-ΔSL1ΔSL3-MS2-Δenv a été construit à partir du plasmide pNL4.3-ΔSL1-MS2-Δenv et un système de cassette pCDNA3.1(+) en utilisant l'enzyme de restriction AatII. Le plasmide MCP-eGFP-NLS contenant la protéine de capside du bactériophage MS2 (MCP: *MS2 Capsid Protein*) a été obtenu par Querido et Chartrand (Querido and Chartrand, 2008) et cette séquence a été incluse dans un plasmide pcDNA3.1(+) en utilisant des enzymes de restriction NheI et HindIII. Les amorces utilisées pour réaliser ces constructions sont décrites dans la Table 1.

Le plasmide exprimant la protéine Gag fusionnée à la protéine reportrice miniSOG et le plasmide pNL4.3 étaient disponibles au laboratoire. La séquence codant la protéine miniSOG est composée de 321 aa et est insérée en C-terminal du gène codant pour protéine MA de Gag (El Meshri et al., 2015; Müller et al., 2004).

Toutes les constructions ont été validées par séquençage ADN.

Plasmides	Amorces	
pNL4.3-ΔNC-MS2-Δenv	aS	5'-ACCATAATGCAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATC-3'
	aAS	5'-TAAAAAATTAGCCTGCATTATGGTAGCTGGATTTGTTAC-3'
pNL4.3-F16A-MS2-Δenv	aS	5'-TGTTAAGTGTGCCAATTGTGGCAA-3'
	aAS	5'-GTCTTTCTTTGGTTCCTAAAATTG-3'
pNL4.3-W37A-MS2-Δenv	aS	5'- AAAGGGCTGTGCGAAATGTGGAAAGGAAGG-3'
	aAS	5'- TTCCTAGGGGCCCTGCAAT-3'
pNL4.3-H23C-MS2-Δenv	aS	5'-AAAGAAGGGTGCATAGCCAAAAATTGC-3'
	aAS	5'-GCCACAATTGAAACACTTAACAGTC-3'
pNL4.3-H44C-MS2-Δenv	aS	5'-AGGAAGGATGCCAAATGAAAGATTGTACTG-3'
	aAS	5'-TTCCACATTTCCAACAGCCCTT-3'
pNL4.3-G2A-MS2-Δenv	aS	5'-AGAGAGATGGCTGCGAGAGC-3'
	aAS	5'-CCTTCTAGCCTCCGCTAGTCA-3'
pNL4.3-Δp6-MS2-Δenv	aS	5'-TTCTTTAGAGCTGACCATAGCCAACAG-3'
	aAS	5'- AATTCCCTGGCCTTCCCTTGTG-3'
pNL4.3-ΔSL1ΔSL3-MS2-Δenv	aS	5'-AAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCG-3'
	aAS	5'-TCAAAATTTTTGGCGTACTCACCAGTCGCC-3'

Table 1 : Amorces utilisées pour amplifier les séquences par PCR ou pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée.

2. Culture cellulaire

Les cellules HeLa (lignée de cellules épithéliales du col de l'utérus) sont cultivées en milieu DMEM (forte teneur en glucose et pyruvate, Gibco™ DMEM, 11500416, Fisher Scientific, Illkirch, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et d'un mélange d'antibiotiques (100 UI de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine). Les cellules sont cultivées à 37°C et 5% de CO_2.

3. Transfection

Les transfections de plasmides ADN dans les cellules ont été réalisées avec 3 µg de plasmide total pour la microscopie confocale (3.10^5 cellules) et 10 µg pour la microscopie électronique (6.10^6 cellules) en flasque 75 cm^3 en utilisant le réactif JetPEI® (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) selon la procédure de transfection préconisée par le fabriquant.

4. Anticorps

L'anticorps primaire monoclonal anti-p24 VIH-1 (6521) a été obtenu auprès du NIH AIDS Reagent (Manassas, États-Unis). L'anticorps primaire monoclonal anti-eGFP (ab6556) a été acheté chez Abcam (Cambridge, Grande-Bretagne). L'anticorps anti-GAPDH (NB100-56875) a été acheté chez

Bio-Techne (Minneapolis, USA). Les anticorps secondaires couplés à l'HRP goat-anti-mouse-HRP (ab6789) et donkey-anti-rabbit-HRP (ab6802) ont été achetés chez Abcam (Cambridge, Grande-Bretagne). L'anticorps secondaire fluorescent goat-anti-mouse Alexa Fluor 594 (ab150116) a également été acheté chez Abcam (Cambridge, Grande-Bretagne). Enfin, les anticorps secondaires couplés à des billes d'or goat-anti-mouse 10 nm (110.022) et goat-anti-rabbit 6 nm (806.011) proviennent de chez Aurion Immuno Gold Reagents (Wageningen, Pays-Bas).

5. Lyse des cellules

Les cellules HeLa exprimant les différentes protéines d'intérêt 24 h après la transfection ont été lavées en PBS, traitées par de la trypsine puis lysées en tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,15% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 0,05% SDS) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (13434189, Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis) pendant 1 h sur glace. Les protéines totales des échantillons ont été dosés par un dosage BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit 23227, Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis).

6. Concentration des particules virales

Les surnageants des cellules HeLa exprimant les différents virus sauvages ou mutants 24 h après la transfection ont été filtrés (0,45 µM) puis concentrés par ultracentrifugation (rotor AH-629 pendant 1h30 à 28000 rpm) sur un coussin de sucrose 20%. Les virus concentrés ont été resuspendus en PBS 1X. La concentration d'antigène CA-p24 contenu dans les virus a été déterminée grâce à un test ELISA p24 (Innotest HIV antigen Mab CE 80563, Fujirebio, Courtaboeuf, France).

7. SDS-PAGE et Western-Blot

Les lysats protéiques ou les particules virales (issues de la concentration par ultracentrifugation) ont été resuspendus dans du tampon Laemlli 4X (Tris-HCl 277,8 mM pH 6,8, glycérol 44,4%, 4,4% SDS, 0,02% bleu de bromophénol, 1610747, Biorad, Marnes-la-Coquette) additionné de 1% de Béta-Mercaptoéthanol puis dénaturées par la chaleur. Les échantillons ont ensuite été déposés dans des gels SDS-PAGE 12% (Eurogentec, Liède, Belgium) pour migration selon leur poids moléculaire et les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF (Amersham, Orsay, France). Les membranes ont été saturées avec une solution de blocage (TBS 50 mM, 0,05% de Tween, 5% de lait) puis incubées avec les anticorps primaires dirigés contre l'antigène p24 ou le gène de ménage GAPDH. Les anticorps secondaires appropriés conjugués à la HRP et dilués dans une solution de blocage ont ensuite été ajoutés. Pour terminer, les protéines ont été mises en évidence grâce à la mise en contact des membranes avec le substrat de Pierce ECL à chimioluminescence améliorée (Thermo Scientific,

Waltham, MA, États-Unis). Le signal a été enregistré avec le système ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Chicago, États-Unis).

8. Marquage immunofluorescent

Une quantité de 3.10^6 cellules HeLa ont été ensemencées dans des plaques de culture 6 puits contenant des lamelles de verre de 20 mm de diamètre. Le lendemain, les cellules sont transfectées par un mélange de plasmides pNL4.3-MS2-Δenv sauvage ou muté et de plasmide MCP-eGFP-NLS (ratio 0,6/0,4). 24 heures post-transfection, les cellules ont été en PFA 4% dilué en PBS 1X (15714, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, États-Unis) pendant 15 min, perméabilisées par une solution de PBS 1X / Triton-X-100 0,2% pendant 20 min et saturées par une solution de PBS 1X / BSA 2% pendant 30 min. La protéine Gag a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-p24 puis par un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome AlexaFluor 594. Pour terminer, les lamelles ont été montées sur des lames en utilisant un mélange au demi de milieu de montage Fluoromount-G® et DAPI Fluoromount-G® (0100-01 et 0100-20, SouthernBiotech, Birmingham, États-Unis).

9. Hybridation *in situ* par fluorescence

Afin de détecter l'ARNg du VIH-1 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), des sondes dirigées contre une séquence à l'interface des séquences codants pour les domaines CA et NC de Gag ont été créés (LGC Biosearch Technologies, Risskov, Danemark). La séquence des sondes est la suivante :
5'-
GCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCA
GGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCC
AGTAGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATG
TATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTA
TGTAGACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATT
GGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAA
GCATTGGGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTGGGGG
GACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGC
TACCATAATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGACTGTTAAGTGTTTCA
ATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCA -3'.
Le mélange de sondes ont une concentration mère de 12,5 µM.

Pour cette expérimentation, 2.10^5 cellules HeLa ont été ensemencées dans une plaque de culture de douze puits contenant des lamelles. Les cellules ont été transfectées avec 3 µg de plasmide pNL4.3

codant pour le génome complet du VIH-1. 24 h après la transfection, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% pendant 15 min, lavées trois fois en en PBS 1X puis perméabilisées avec du Triton-X100 0.1% pendant 5 min puis lavées deux fois en PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées en chambre humide avec 50 µL de tampon d'hybridation (Stellaris® RNA FISH Hybr. Buffer, SMF-HB1-10, LGC Biosearch Technologies, Risskov, Danemark) supplémenté de formamide déionisé au 1/10ème et dans lequel ont été diluées les sondes biotinylées au 1/100ème et l'anticorps anti-p24 VIH-1 au 1/200ème pendant 4 h à 37°C. Après incubation, les lamelles ont été déposées dans 1 mL de tampon de lavage A (Stellaris® RNA FISH Wash Buffer A, SMF-WA1-60, LGC Biosearch Technologies, Risskov, Danemark) supplémenté de formamide déionisé au 1/10ème, de streptavidine fluorescente 650 nm (Streptavidin, DyLightTM 650 conjugated 84547, Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis) diluée au 1/1000ème et l'anticorps secondaire goat-anti-mouse 488 nm au 1/6000ème pendant 1 h à 37°C. Après incubation, les lamelles ont été rincées avec 1 mL de tampon de lavage B (Stellaris® RNA FISH Wash Buffer B, SMF-WB1-20, LGC Biosearch Technologies, Risskov, Danemark) pendant 5 min à TA, lavée deux fois en PBS 1X puis montées sur des lames de verres avec une solution de Fluoromount-G® (SouthernBiotech, Birmingham, États-Unis).

10. Microscopie confocale

Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal inversé (Leica TCS SP8 g-STED 3X 12) équipé d'un objectif à immersion de 63×1,4NA (HXC PL 13 APO 63x/1,40 OIL CS) (Leica Microsystems, Nanterre, France). La fluorescence des deux composants viraux d'intérêt dans les cellules a été acquise en mode séquentiel. Les images eGFP ou miniSOG ont été obtenues en balayant les cellules avec un laser à 488 nm et une bande passante réglée entre 500 et 555 nm pour l'émission. Pour les images Alexa 594, une ligne laser à 598 nm a été utilisée avec une bande passante à 605-730 nm pour l'émission.

11. Tri cellulaire

Les cellules HeLa transfectées ont été traitées 24 h après la transfection avec de la trypsine puis resuspendues dans du milieu DMEM complet (10% SVF décomplémenté, 1% d'antibiotiques). Le logiciel BD FACS ChorusTM (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis) a été utilisé pour réaliser un « gating ». Les cellules ont été triées selon leur expression de la protéine eGFP grâce à une canule de 100 µM. Entre 3.10^5 et 1.10^6 cellules HeLa positives pour la GFP ont été triées à une vitesse de 6000 cellules/seconde directement dans des tubes FACS de 5 mL contenant du milieu complet afin de minimiser le stress cellulaire.

12. Préparation des cellules pour la microscopie électronique à transmission selon la méthode Tokuyasu

Les cellules HeLa exprimant les plasmides pNL4.3-MS2-Δenv sauvage ou mutés et pMCP-eGFP-NLS ont été fixées 24 heures après la transfection avec un mélange de PFA 4% et glutaraldéhyde 0,1% en tampon phosphate selon Sorensen (pH 7,6) pendant 2 h à 4°C et sous rotation. Les cellules ont été rincées deux fois avec une solution de PBS 1X puis incluses en gélatine 12% à température ambiante. La gélatine a été solidifiée par passage à 4°C pendant une demi-heure puis les cellules ont été coupées en petits cubes et deposées dans une solution de sucrose 2,3 M pour cryo-protection pendant une nuit à 4°C sous rotation. Dans un premier temps, le bloc de gélatine contenant les cellules a été surfacé avec un couteau de diamant TRIM afin de créer une surface plane (Diatome, LFG Distribution, Sainte Consorc, France) puis a été taillé afin de former une pyramide. Des coupes semi-fines de 200 µM de d'épaisseur ont été récupérées sur une lame de verre et colorées au bleu de toluidine afin de vérifier la présence de cellules. Dans un second temps, des coupes ultrafines de cellules de 70 à 90 nm d'épaisseur ont été réalisées à -120°C avec un cryo-ultramicrotome (Leica EM FC7, Leica Microsystems, Nanterre, France) et des couteaux de diamant (Diatome, LFG Distribution, Sainte Consorc, France). Les sections ont été récoltées dans un mélange au demi de méthylcellulose 2% et de sucrose 2,3 M et déposées sur des grilles de nickel traitées avec du carbone et recouvertes d'un film de formvar.

13. Immunomarquage par des nanoparticules d'or et observation au microscope électronique à transmission

Les grilles de nickel arborant les coupes ultrafines de cellules ont été déposées sur des gouttes de 100 µL de PBS 1X pendant 10 min à 37°C pour faire fondre le film de sucrose/méthylcellulose. Les grilles ont été rincées trois fois sur des gouttes PBS 1X puis les cellules ont été saturées pendant 30 min à TA avec 50 µL d'une solution BSA© (Aurion, Wageningen, Pays-Bas). Les cellules ont été rincées avec une solution PBS 1X-0.1% BSA© (3 x 2 min) puis incubées avec 30 µL d'anticorps primaires anti-p24 et anti-GFP dilués en PBS 1X-0.1% BSA© pendant 1 h à TA. Les cellules ont été de nouveau rincées en PBS 1X-0.1% BSA© (6 x 2 min) puis incubées avec les anticorps secondaires goat-anti-mouse et goat-anti-rabbit couplés à des nanoparticules d'or de 10 nm et 6 nm respectivement (Aurion, Wageningen, Pays-Bas) pendant 1 h à TA. Les cellules ont été rincées par passage sur des gouttes de PBS 1X-0.1% BSA© (6 x 2 min), de PBS 1X (5 x 2 min) et d'eau stérile (3 x 2 min). Après ces lavages, les cellules ont été contrastées par de l'acétate d'uranyle dilué au 1/10ème en méthylcellulose 2%. Enfin, l'observation des grilles a été réalisée grâce à un microscope électronique à transmission (JEOL JEM-1011, Croissy Sur Seine, France).

14. Microscopie corrélative à fluorescence et électronique à transmission (CLEM) par MET classique

Les cellules HeLa ont été ensemencées dans des boites IBIDI quadrillées (IBIDI µDish 35 mm high Grid-500, IBIDI GmbH, Gräfelfing, Allemagne) à raison de 3.10^5 cellules par boite. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 3 µg d'un mélange de plasmides Gag et Gag-miniSOG ou pNL4.3 et Gag-miniSOG (ratios 0,7/0,3) puis incubées à 37°C/5%CO_2. 24 h après la transfection, les cellules ont été rincées en eau stérile puis fixées pendant dix min avec du PFA 4% puis rincées de nouveau en eau stérile. Les cellules présentant un phénotype d'intérêt d'expression de la protéine Gag-miniSOG ont été imagées en z-stack par microscopie confocale ainsi qu'en lumière blanche. Les cellules ont été photo-oxydées avec de la diaminobenzidine pendant une dizaine de minutes jusqu'à l'apparition de polymères osmiophiles marrons. Le quadrillage où se situe chaque cellule d'intérêt a été annoté afin de retrouver la cellule par la suite. Les cellules ont ensuite été rincées puis fixées sur la nuit à 4°C avec du fixateur selon Trump (4% Paraformaldéhyde + 1% Glutaraldéhyde). Le lendemain, les cellules ont été lavées en tampon phosphate selon Sorensen, post-fixées avec une solution de tétraoxyde d'osmium OsO4 à 2% pendant 1h, déshydratées dans des bains d'éthanol de degrés croissants (Table 2).

	Nombre de bains	Temps (minutes)
Éthanol 70°	2	10
Éthanol 90°	2	15
Éthanol 100°	3	20

Table 2 : Déshydratations des cellules dans des bains d'éthanol de concentration croissante.
Suite aux déshydratations, les cellules sont pré-imprégnées dans deux bains d'un mélange résine épon /alcool 100° pendant 1 h à TA. Les cellules sont imprégnées dans de la résine épon pure toute la nuit à 4°C. Le lendemain, la résine épon est remplacée par de la résine fraiche afin d'y inclure les cellules en la laissant polymériser pendant 48 h à 65°C.

Une fois les cellules incluses en résine, elles ont été individualisées dans des cubes de résine par une découpe à la scie à métaux (Figure 31). Les cellules ont été visualisées grâce à la formation de formation de polymères osmiophiles marrons suite à la photo-oxydation au DAB ainsi que grâce à la présence du quadrillage des boites de culture imprimé dans la résine.




Figure 31 : Identification des cellules incluses et découpe de la résine epon à la scie à métaux.

L'excédent de résine a été ôté grâce à un pyramitome puis les blocs de résines ont été taillés du côté de l'échantillon à l'aide d'une lame de rasoir afin d'éliminer l'excédent de résine et d'obtenir la forme d'une pyramide tronquée de section trapézoïdale. Dans un premier temps, des coupes semi-fines de 0,5 µm à 1 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un couteau histodiamant (Diatome, LFG Distribution, Sainte Consorc, France) et un ultramicrotome (Leica EM UC7, Leica Microsystems) afin de sélectionner la zone de coupe du bloc qui présente un intérêt pour l'observation en MET. Ces coupes ont été récupérées sur lame de verre, colorées avec du bleu de toluidine filtré et observées en microscope optique. Dans un second temps, des coupes de cellules ultrafines (entre 70 et 90 nm d'épaisseur) ont été réalisées grâce à un couteau de diamant (Diatome, LFG Distribution). Plusieurs facteurs peuvent définir la qualité des coupes effectuées tels que l'inclinaison du couteau par rapport au bloc (entre 5 à 8° selon le couteau), la vitesse de coupe (1 mm/sec), le niveau d'eau dans le godet du couteau doit être parfaitement ajusté, de façon à voir le reflet gris brillant du couteau dans l'eau, l'épaisseur des coupes. L'épaisseur des coupes est appréciée en fonction de leur couleur qui doit être jaunes-pailles ou blanches (les grises sont trop fines et les rosées trop épaisses). Les coupes ultrafines ont été récupérées sur des grilles de nickel à mèche de 3 mm de diamètre.

Pour terminer, les cellules ont été contrastées à l'acétate d'uranyle dans l'alcool éthylique absolu (volume à volume dans l'eau) pendant 10 min, puis au citrate de plomb pendant 10 min. Les grilles ont été observées grâce à un MET (JEOL JEM-1011, Plateforme IBiSA, Tours).

15. Microscopie corrélative à fluorescence et électronique à transmission (CLEM) par congélation haute pression et substitution à froid

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des plaques 12 puits contenant des disques sapphires quadrillés de 6 mm (Leica Microsystems, Nanterre, France) à raison de 2.10^5 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 3 µg d'un mélange de plasmides pNL4.3-MS2-eGFP, Gag-mCherry et MS2-eGFP-NLS (ratios 0,4 / 0,4 / 0,2). 24 h après la transfection, les cellules présentant une colocalisation d'intérêt ont été imagées en live par microscopie confocale ainsi qu'en

lumière blanche. La position de chaque cellule a été déterminée grâce au quadrillage. Rapidement après observation, les cellules ont été cryo-fixées dans de l'azote liquide et à très haute pression avec un système de congélation haute pression (Leica EM ICE, Leica Microsystems, Nanterre, France). Les disques sapphires contenant les cellules cryo-fixées ont ensuite été transférés dans un appareil de substitution à froid (Leica EM AFS2, Leica Microsystems, Nanterre, France) pour que l'eau des cellules soit progressivement remplacée par de l'éthanol en prévision de leur inclusion à froid dans une résine hydrophile K4M. Le programme suivant est appliqué :

Réactif	Température de départ (°C)	Température d'arrivée (°C)	Temps (h)
Éthanol 100°	-90	-90	10
Éthanol 100°	-90	-85	2
Éthanol 100°	-85	-80	2
Éthanol 100°	-80	-30	5
Éthanol 100°	-30	-35	1
Résine K4M 50%	-35	-35	1
Résine K4M 80%	-35	-35	1
Résine K4M	-35	-35	1
Résine K4M	-35	-35	15
Résine K4M + UV	-35	+20	96

Table 3 : Programme appliqué pour la substitution à froid et l'inclusion en résine K4M des cellules. Le programme est appliqué automatiquement par l'AFS2. La résine K4M est mélangée avec de l'éthanol 100° lors des mélanges.

Les blocs de résine pris en masse ont été ôtés des tubes en plastique grâce à une pince puis les disques sapphires sont décollés de la résine à un choc thermique (passage en azote liquide pendant 5 secondes puis passage en eau bouillante) afin d'exposer les cellules. Des coupes ultrafines des cellules (80 nm) à TA ont été réalisées parallèlement à la surface de coupe afin d'être dans le même plan d'observation que la microscopie confocale puis ont été récupées sur des grilles de niquel membranées.

Pour terminer, un immunomarquage avec des nanopraticules d'or a été réalisé sur les grilles. Les aldéhydes libres ont été inactivés par dépôt des grilles sur des gouttes de 50 µL de PBS 1X/Glycine 0,1% pendant 10 min puis les cellules ont été saturées avec 50 µL de solution BSA© (Aurion Immuno Gold Reagent, Wageningen, Pays-Bas) pendant 10 min. Les grilles ont été incubées pendant 1 h avec 30 µL d'un mélange d'anticorps primaires (anti-p24 et anti-GFP) dilués comme décrit précédemment en PBS1X/BSA© 0,2% pendant 1 h. Les cellules ont été rincées en PBS 1X/BSA© 0,2% (6 x 2 min), en PBS 1X (6 x 2 min) et en eau stérile (4 x 2 min). Les complexes ont été fixés avec 50 µL de glutaraldéhyde 2% dilué en eau stérile pendant 5 min. Les cellules ont de nouveau été rincées en eau stérile (6 x 2 min) puis incubées avec d'un mélange d'anticorps secondaires (goat-anti-mouse 10 nm

et goat-anti-mouse 6 nm) dilués comme décrit précédemment en PBS1X/BSA© 0,2% pendant 1 h. Les cellules ont été rincées en PBS 1X/BSA© 0,2% (6 x 2 min), en PBS 1X (6 x 2 min), en eau stérile (4 x 2 min) puis contrastées en acétate d'uranyle dilué au demi pendant 10 min puis en citrate de plomb pendant 5 min.

16. Analyse morphométrique des nanoparticules d'or

Afin d'analyser la distance séparant Gag et l'ARNg sur les images de microscopie électronique à transmission, la distance moyenne entre les billes d'or a été analysée et mesurée. Tout d'abord, la dynamique de l'image a été modifiée non-linéairement afin d'augmenter le contraste des nanoparticules d'or. La méthode est basée sur une transformée en ondelettes "à trous" de l'image suivie par un seuillage des coefficients non-significatifs et une corrélation multi-échelle. Cette approche permet une détection des nanoparticules d'or tout en étant plus robuste aux bruits et aux textures locales. Les spots non-circulaires spots ont été éliminés, puis la surface des billes a été convertie en leur diamètre équivalent et séparées en deux classes selon la taille des pixels. Pour terminer, les billes d'or ont été analysées selon leur distribution spatiale puis la distance minimale moyenne entre chaque bille d'or de 10 nm et les billes de 6 nm environnantes a été calculée.

17. Hybridation *in situ* par microscopie électronique à transmission

Le tapis de cellules HeLa exprimant 10 µg de plasmide pNL4.3 ont été fixées 24 h après la transfection avec 5 mL une solution de paraformaldéhyde 4% et glutaraldéhyde 0,2% en tampon cacodylate 0,1M (pH 7,2) pendant 30 min à 4°C. Les cellules ont ensuite culottées par centrifugation de 5 min à 2500 rpm puis re-suspendues avec 1 mL du même fixateur pendant 1 h à 4°C sous rotation. Les cellules ont été rincées deux fois en tampon cacodylate 0,1M (pH 7,2) puis traitées par la méthode Tokuyasu comme décrit dans la partie 12. De coupes ultrafines de cellules ont été réalisées comme décrit précédemment.

Pour l'immunomarquage avec des nanoparticules d'or, les grilles de MET abritant les coupes cellulaires ont été incubées pendant 3 h à 37°C en chambre humide avec 30 µL d'une solution d'hybridation contenant les sondes biotinylées diluées au 1/100ème. Les grilles ont ensuite été rincées trois fois pendant 10 min avec une solution de SSC 2X. Les structures ont été stabilisées avec 50 µL de PFA 4% dilué en SSC 2X pendant 5 min. Les cellules ont été rincées en tampon SSC 2X (2 x 5 min) puis incubées avec 30 µL de strepatividine couplée à des billes d'or de 6 nm (Streptavidin 6nm, STR-90221/2, Aurion Immuno Gold Reagent, Wageningen, Pays-Bas) et diluées au 1/100ème en tampon Tris 20 mM / NaCl 300 mM pendant 1h à 37°C. Les cellules ont été rincées en tampon Tris/NaCl (2 x 5 min) et en tampon SSC 2X (1 x 5 min). Les complexes ont été fixés avec 50 µL d'une

solution de glutaraldéhyde 2,5% dilué en SSC 2X pendant 5 min. Les grilles ont été rinçées en eau distillée (4 x 2 min) puis contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle dilué au 1/10ème en méthylcellulose pendant 10 min.

18. Analyses statistiques

Les analyses statiques ont été menées avec le logiciel R Studio et à partir de données provenant d'au minimum trois expériences indépendantes. Les échantillons comparés présentent une hétérogénéité dans leurs variances. Les analyses ont donc été menées sur la base de procédures prenant en compte cette problématique d'hétéroscédasticité. Pour chaque technique de microscopie, la comparaison des différentes conditions a été précédée d'une analyse de variance avec une correction de Welch. Lorsque cette analyse conduisait à un rejet de l'hypothèse nulle, les comparaisons des conditions deux à deux ont été réalisées à l'aide de la procédure de Games-Howell qui garantie le contrôle du risque de première espèce lors de l'analyse. Pour chaque comparaison d'intérêt l'amplitude de la différence entre deux conditions a été estimée à partir du paramètre d de Cohen prenant en compte la correction de Welch. L'intervalle de confiance associé à cette taille d'effet a été estimé par la méthode des quantiles sur un panel de 1000 échantillon générés par bootstrap. Le seuil de risque alpha = 0,05 a été retenu pour l'ensemble des analyses. La significativité des résultats a été analysée en tenant compte de la p value, de la taille d'effet et de l'IC95. La taille d'effet est une mesure standardisé de l'importance du phénomène étudié. Dans le cas d'une comparaison de moyennes, la taille d'effet fait référence à l'importance de la différence entre les deux moyennes pondérée par la variance des échantillons. Lors de la comparaison de deux mutants, plus la taille d'effet est faible plus les échantillons partagerons la même plage du phénomène étudié. L'IC95 représente l'intervalle de confiance à 95% contenant la moyenne X de la population. Elle permet de donner une estimation de l'incertitude que l'on a sur la vraie valeur du paramètre que l'on cherche à estimer. Plus l'intervalle est restreint, plus l'estimation émise est fiable.

RÉSULTATS

Afin de suivre et de localiser en contexte cellulaire l'association entre la protéine Gag du VIH-1 et l'ARN génomique, plusieurs approches de microscopie ont été utilisées sur des cellules HeLa : la technique Tokuyasu associée à un immunomarquage avec des nanoparticules d'or et la microscopie corrélative. Ces expériences ont été menées essentiellement avec Gag détectée par un anticorps et un pNL4.3 exprimant l'ARN sauvage (visualisé par FISH) ou modifié par une cassette MS2 et détecté par MCP-eGFP-NLS. Toutes ces approches sont décrites dans les parties suivantes.

Partie 1 : Étude de la formation de complexes formés de Gag et de l'ARNg par microscopie électronique à transmission et analyse quantitative dans des cellules HeLa

La première approche utilisée pour répondre à notre problématique fut la technique Tokuyasu sur cellules HeLa suivie d'un double immunomarquage avec des nanoparticules d'or colloïdal dirigées contre la protéine Gag et l'ARNg.

1. Localisation cellulaire de Gag et de l'ARNg par microscopie confocale et MET

Afin de détecter l'ARNg viral par microscopie confocale et MET, le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv (Ferrer et al., 2016) exprimant l'ARNg du VIH-1 a été utilisé. Ce dernier possède 24 tiges-boucles provenant du bactériophage MS2 (Figure 32, symboles orange) (Bertrand et al., 1998; Querido and Chartrand, 2008) introduites au niveau du gène *pol* et qui remplacent la transcriptase inverse tout en conservant la fonction de la protéase virale. Les tiges-boucles MS2 interagissent avec les protéines MS2 (*MS2 Coat Proteins,* MCP) fusionnées à la protéine fluorescente eGFP et arborent un signal de localisation nucléaire (MCP-eGFP-NLS, cercles verts). Ce plasmide exprime l'ARNg-MS2-Δenv sous le contrôle du promoteur LTR viral. Il est délété du gène codant pour les protéines d'enveloppes mais contient ceux codant pour la protéine Gag, les protéines régulatrices (Tat et Rev) et les protéines auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu, Nef). Il est à noter que l'absence de promoteur CMV et l'expression en *cis* de Gag nous permettent de suivre les associations formées par Gag et l'ARNg dans des conditions plus physiologiques et d'éviter ainsi toute perturbation dû à l'apport de Gag en *trans* (Becker and Sherer, 2017; Nikolaitchik et al., 2006). La région 5'UTR contient des domaines hautement structurés importants pour différentes étapes de la réplication du VIH-1, notamment les quatre tiges-boucles SL1 à SL4.

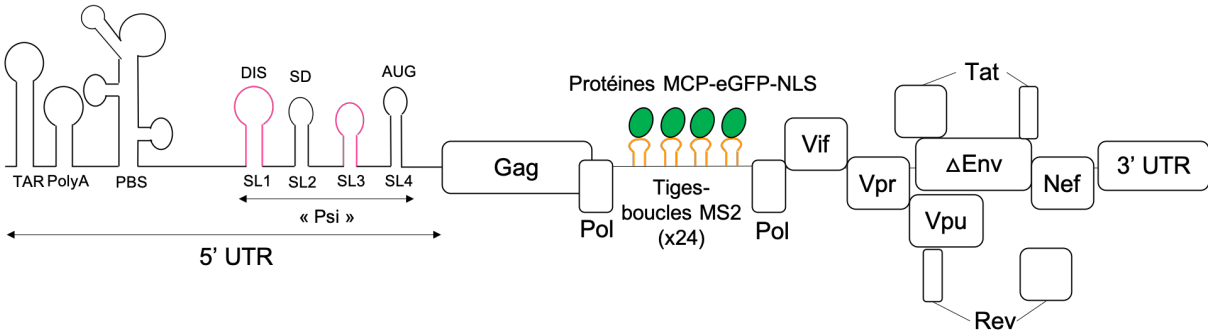


Figure 32 : Schéma détaillé de la structure de l'ARNg-MS2-Δenv.
L'ARNg-MS2-Δenv est exprimé à partir du plasmide pNL4.3-MS2-Δenv puis traduit sous le contrôle du promoteur VIH-1 LTR en protéines virales sauf Env, RT et IN. Cet ARNg-MS2-Δenv est détecté par l'insertion dans le gène *pol* de 24 tiges-boucles MS2 (symboles orange) qui interagissent avec les protéines MCP-eGFP-NLS (cercles verts). SL1 et SL3 ont été délétées dans nos expérimentations (en rose).

La première étape de ce travail fut de détecter la protéine Gag et l'ARNg par microscopie confocale et MET. Pour la microscopie confocale, l'ARNg a été détecté grâce à la fluorescence de la protéine MCP-eGFP-NLS et Gag par immunofluorescence avec un anticorps anti-CA p24. Pour la MET, les techniques classiques de préparation d'échantillons ne permettent pas l'utilisation d'anticorps pour détecter des antigènes présents dans nos échantillons. La technique Tokuyasu a ainsi été utilisée, permettant de préparer à froid des cellules fixées chimiquement pour ensuite réaliser un immunomarquage des structures d'intérêt avec des nanoparticules d'or colloïdal.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec deux plasmides exprimant l'ARNg et la MCP-eGFP-NLS puis fixées vingt-quatre heures après la transfection, incluses en gélatine et cryo-protégées dans une solution de sucrose (Figure 33 A). Des coupes ultrafines de cellules ont été réalisées à froid (Figure 33 B) puis déposées sur des grilles de microscopie électronique (Figure 33 C). Les structures virales d'intérêt, la protéine Gag et l'ARNg, sont détectées avec des anticorps anti-p24 et anti-eGFP, suivi d'anticorps secondaires couplés respectivement à des billes d'or de 10 nm et 6 nm de diamètre (Figure 33 C). Pour terminer, les cellules sont contrastées avec de l'acétate d'uranyle et observées avec un MET.

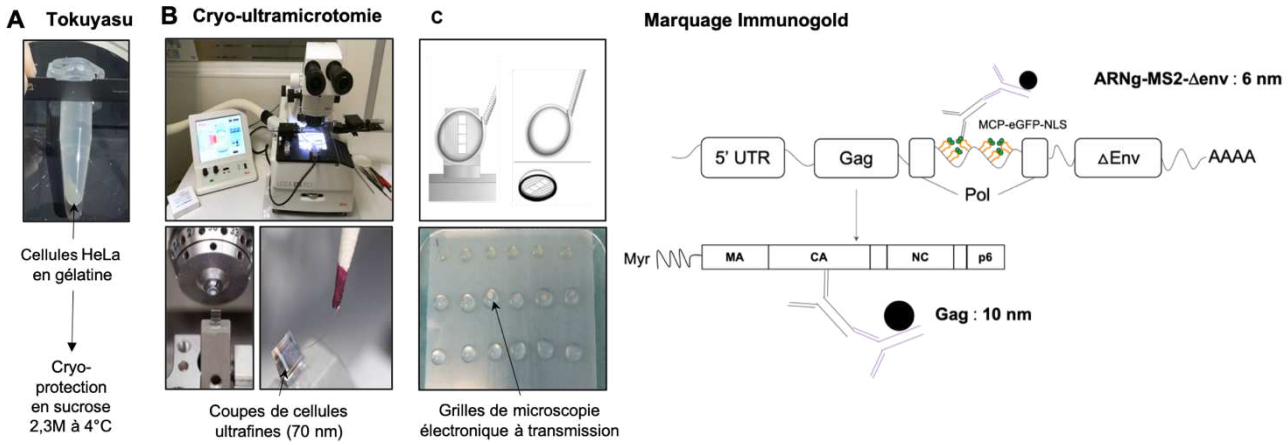


Figure 33 : **Préparation des cellules pour la MET par technique Tokuyasu et marquage immunogold.** A) Les cellules HeLa transfectées avec les plasmides exprimant l'ARNg du VIH-1 et la protéine MCP-eGFP-NLS sont fixées avec du paraformaldéhyde 4%/glutaraldéhyde 0,1%, incluses en gélatine puis cryo-protégées en sucrose 2,3 M. B) Des coupes ultrafines de cellules sont réalisées avec un cryo-ultramicrotome à -120°C. C) Ces coupes sont récupérées puis déposées sur des grilles de MET en nickel recouvertes d'un film de formvar et carbonées. Un marquage de Gag et de l'ARNg est ensuite réalisé avec un anti-capside p24 et un anti-eGFP suivi d'anticorps couplés à billes d'or de 10 nm et de 6 nm respectivement.

Un important travail de mise au point a été réalisé pour optimiser l'immunomarquage (Figure 34). En effet, les cellules transfectées mais marquées uniquement avec l'anticorps secondaire goat-anti-mouse de 10 nm (GAM10) montraient beaucoup de signaux non-spécifiques (Figure 34 A). Il est à noter que l'anticorps secondaire goat-anti-rabbit de 6 nm permettant de détecter la protéine MCP-eGFP-NLS ne présente pas de signal non-spécifique. Afin de diminuer le bruit de fond provoqué par le GAM10, deux solutions ont été apportées. En premier lieu, les coupes de cellules ont été saturées avec une solution de passivation commerciale (BSAc® de chez Aurion) (comparer Figure 34 A et Figure 34 B). En second lieu, l'anticorps secondaire GAM10 a été dilué au 1/50ème, ce qui a considérablement diminué le bruit de fond (Figure 34 B). L'ajout de ces deux étapes dans le protocole a permis d'obtenir des cellules présentant très peu de signaux non-spécifiques tout en conservant un marquage spécifique de la protéine Gag (Figure 34 D).

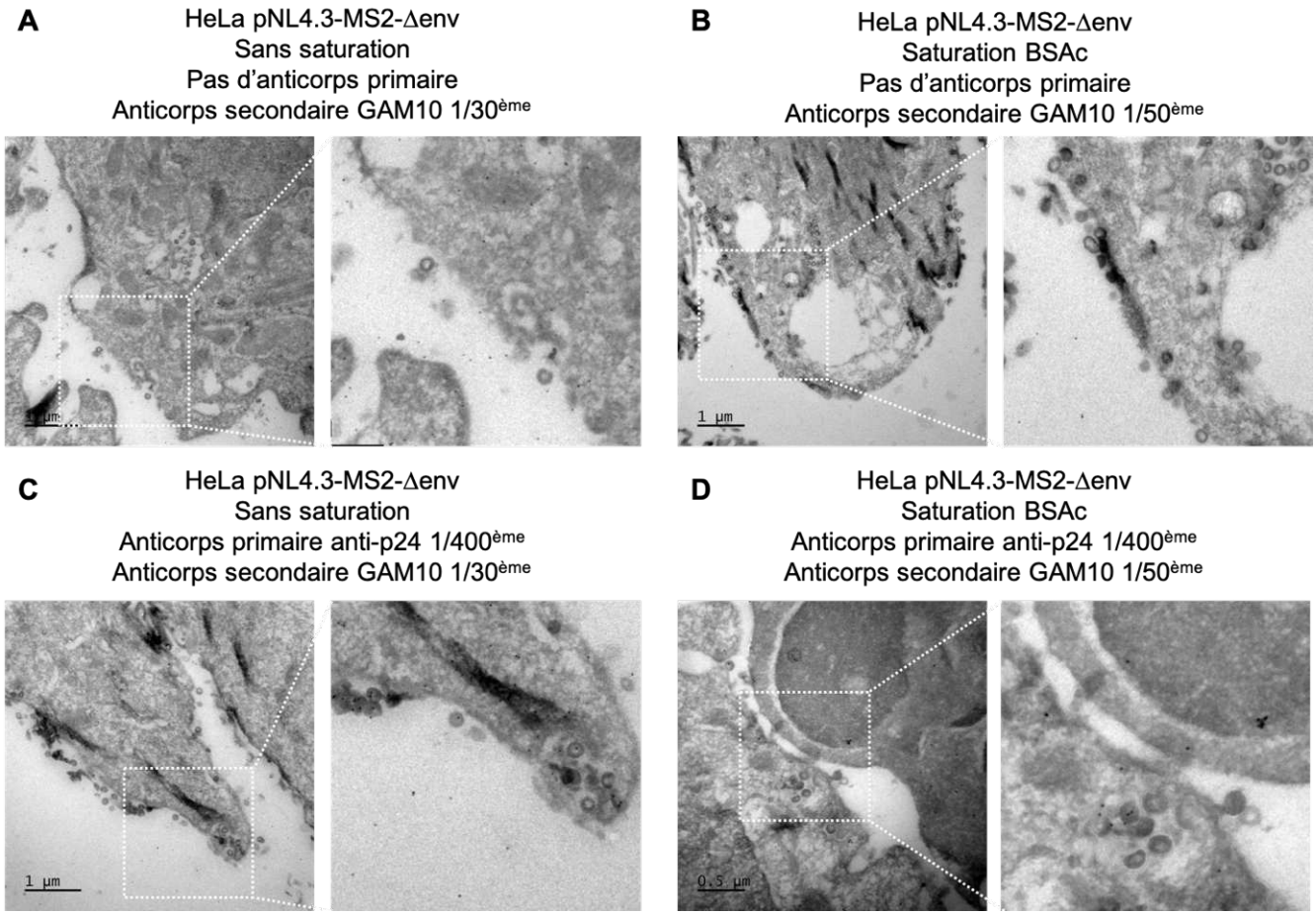


Figure 34 : **Optimisation de l'immunomarquage avec des nanoparticules d'or**
A) Contrôle négatif des cellules cellulaires HeLa transfectées avec le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv, non-saturées, non-marquées avec l'anticorps primaire anti-p24 mais marquées avec l'anticorps secondaire GAM10 dilué au 1/30ème. B) Comme A avec l'anticorps secondaire GAM10 dilué au 1/50ème. C) Cellules cellulaires HeLa transfectées avec le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv, non-saturées, marquées avec l'anticorps primaire anti-p24 dilué au 1/400ème et avec l'anticorps secondaire GAM10 dilué au 1/30ème. D) Comme C avec l'anticorps secondaire GAM10 dilué au 1/50ème. GAM10 : Goat anti mouse 10 nm

Puis, l'expression et la localisation des protéines Gag et MCP-eGFP-NLS seules ont été suivies par microscopie confocale et MET 24 h post-transfection (Figure 35). En microscopie confocale, la protéine Gag est essentiellement exprimée dans le cytoplasme des cellules sous forme diffuse ou ponctuée. Elle s'accumule également au niveau de la membrane plasmique, soulignant probablement la formation de particules virales entrainant un signal fluorescent plus intense (Figure 35 a). En accord avec les travaux de Parent et al., quelques petits points fluorescents de Gag sont également détectés dans le noyau cellulaire (Tuffy et al., 2020). Par MET, Gag s'assemble sous forme de virus ayant bourgeonnés à la membrane plasmique et marqués par des billes d'or de 10 nm (Figure 35 b, inserts 1 et 2). Cette observation est en accord avec de nombreuses études ayant également montré une accumulation de Gag à la MP (El Meshri et al., 2015; Jouvenet et al., 2009). Parfois, certains virus non

marqués sont détectés (Figure 35 b, insert 2, flèche bleue), ce qui peut être dû à un problème d'accessibilité aux épitopes sur la coupe cellulaire. Des billes d'or individuelles ou en petits regroupements sont également observées dans le cytoplasme et pourraient correspondre à des monomères ou à de petits oligomères de Gag diffusant dans le cytoplasme ou en cours d'assemblage.

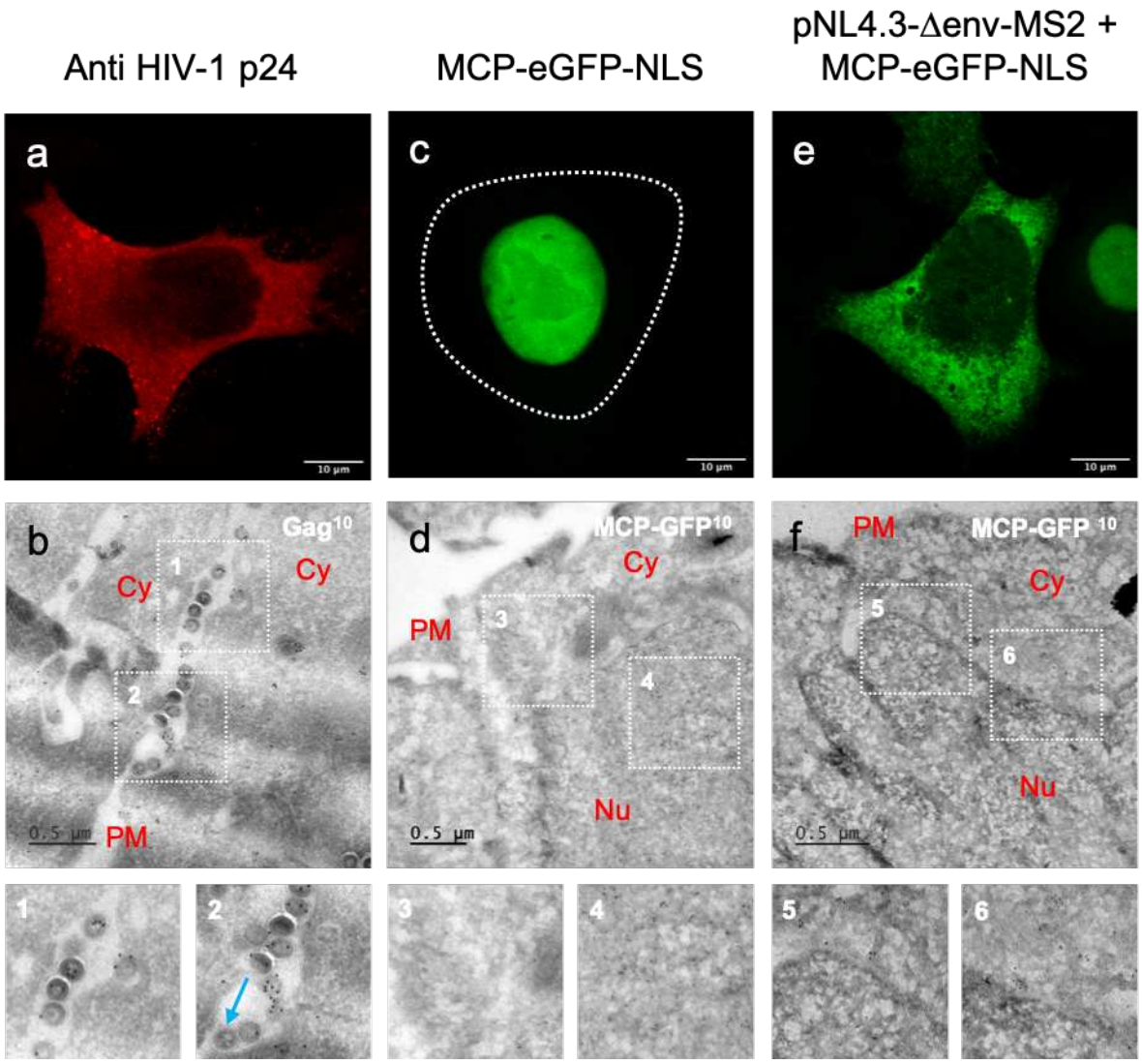


Figure 35 : Expression de la protéine Gag, de l'ARNg-MS2-Δenv et de la protéine MCP-eGFP-NLS par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission.
Expression de la protéine Gag du VIH-1 révélée par un anti-p24 (a, b), de la protéine MCP-eGFP-NLS (c, d) et de la protéine MCP-eGFP-NLS liée à l'ARNg-MS2-Δenv (e, f) dans les cellules HeLa à 24 h PT et observé par microscopie confocale (a, c, e) et MET (b, d, f). La flèche bleue sur l'insert 2 représente un virion non-marqué. N : Noyau, Cy : Cytoplasme, MP : Membrane Plasmique.

La protéine MCP-eGFP-NLS exprimée seule se retrouve confinée majoritairement dans le noyau cellulaire en microscopie confocale (Figure 35 c) (Bertrand et al., 1998; Fusco et al., 2003; Jouvenet et al., 2009; Kemler et al., 2010) et parfois légèrement dans le cytoplasme (non-montré). Par MET, la

MCP-eGFP-NLS est également retrouvée dans le noyau sous forme de billes d'or de 6 nm (Figure 35 d, insert 2). Très peu de billes d'or correspondant à la MCP-eGFP-NLS sont détectées dans le cytoplasme cellulaire, soulignant la spécificité du marquage de cette protéine par les anticorps et son confinement dans le noyau (Figure 35 d, insert 1). Quand l'ARNg et la protéine MCP-eGFP-NLS sont co-exprimés, la protéine MCP-eGFP-NLS peut rester dans le noyau ou bien être exportée avec l'ARNg dans le cytoplasme, comme cela est nettement visible par microscopie confocale (Figure 35 e). Ce phénomène est attribuable à l'action de la protéine virale Rev qui permet l'export de l'ARNg non-épissé (Fusco et al., 2003). Par MET, la protéine MCP-eGFP-NLS en présence de l'ARNg est également détectée dans le noyau mais également dans le cytoplasme sous forme de regroupements de nanoparticules d'or de 6 nm (Figure 35 f, inserts 5 et 6).

2. Visualisation des associations de Gag avec ARNg dans le cytoplasme et à la membrane plasmique en fonction du temps par microscopie confocale et MET

Pour évaluer le recrutement de l'ARNg par la protéine Gag et leur traffic intracellulaire, les cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides pNL4.3-MS2-Δenv et pMCP-eGFP-NLS ont été observées à trois temps post-transfection (12 h, 24 h, 48 h) par microscopie confocale et par MET (Figure 36).

Par microscopie confocale, l'étude d'environ trente cellules a montré que Gag est exprimée sous forme diffuse dans le cytoplasme et s'accumule à la membrane plasmique sous forme de spots rouges fluorescents tandis que la protéine MCP-eGFP-NLS liée à l'ARNg est majoritairement cytoplasmique et quelques fois nucléaire. Une colocalisation de Gag et de l'ARNg exprimant la MCP-eGFP-NLS est observée aux trois temps post-transfection évalués. À chaque temps, Gag et l'ARNg sont colocalisés sous forme diffuse dans le cytoplasme des cellules. Gag s'accumule à la MP tandis que l'ARNg reste diffus dans le cytoplasme, ce qui sous-entend une accumulation partielle de Gag avec l'ARNg à la MP. Le coefficient r de Pearson, représentant une corrélation entre deux signaux a été évalué. Ici, ce coefficient permet d'estimer la colocalisation entre deux fluorophores, soit dans notre étude entre Gag et l'ARNg. Pour la condition sauvage, le coefficient r moyen est de 0,63 +/- 0,09 (Table 4). Il y a donc une corrélation entre Gag et l'ARNg, étant donné que toute valeur supérieure à 0,5 est synonyme de colocalisation. La microscopie confocale a donc permis de décrire les phénotypes d'expression de Gag et de l'ARNg dans les cellules transfectées et d'apprécier leur colocalisation dans le cytoplasme. Cependant, la localisation cellulaire précise de ces deux constituants du VIH-1 et la formation ou non de virus ne peuvent pas être déterminés avec ce type de microscopie optique.

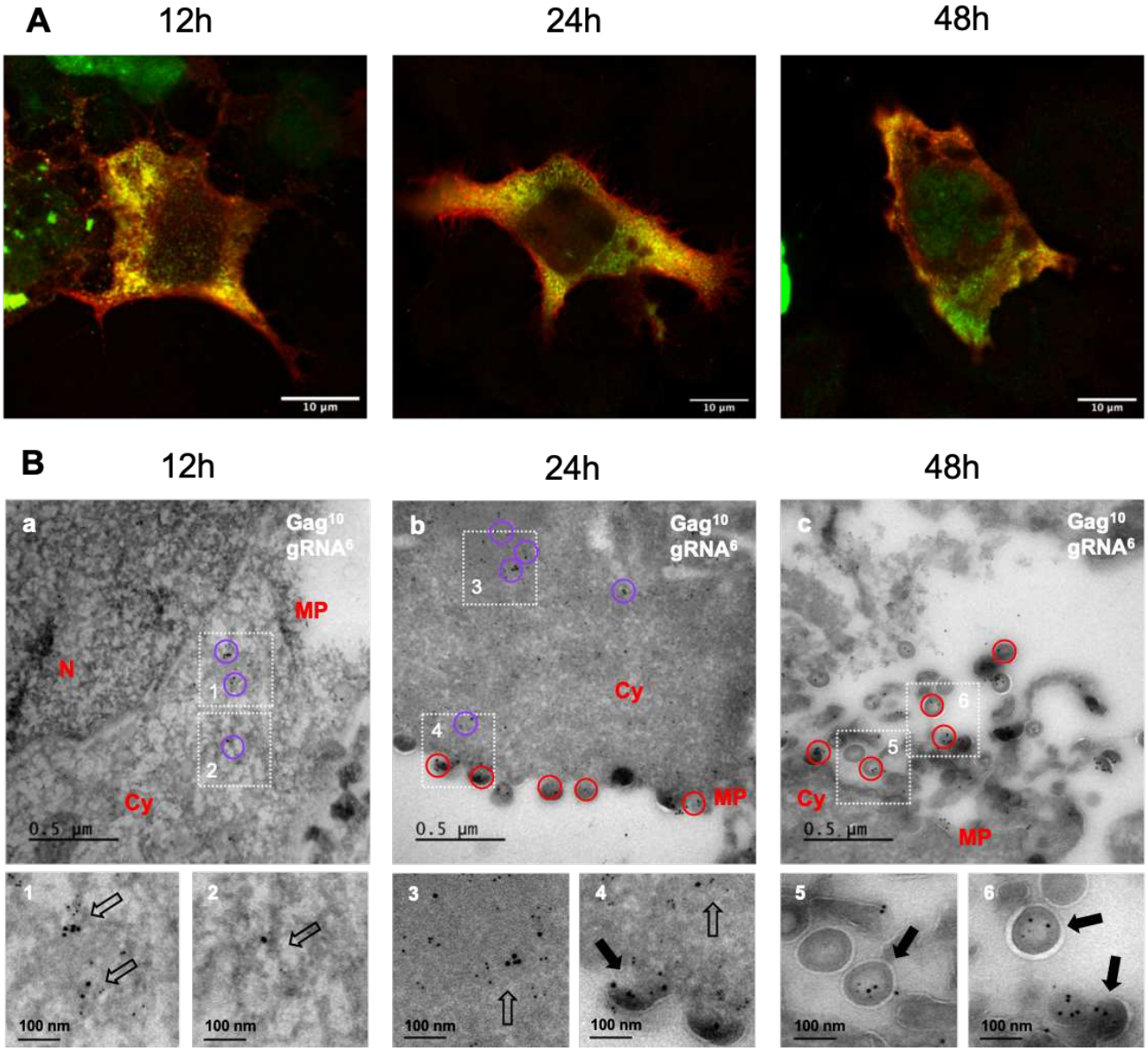


Figure 36 : Visualisation de Gag et de l'ARNg-MS2-Δenv en fonction du temps par microscopie confocale et par MET. Les cellules HeLa ont été transfectées avec un mélange de plasmides exprimant l'ARNg-MS2-Δenv et la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Après 12 h, 24 h or 48 h d'expression, les cellules ont été préparées, marquées et observées pour la microscopie confocale (A) ou la MET (B) comme décrit dans la figure 35. Les encarts 1 à 6 représentent des clusters Gag-ARNg, soit libres dans le cytoplasme (flèches vides) ou associés avec un virus (flèches pleines). L'échelle est reportée en bas à gauche. Il est à noter qu'aux temps post-transfection précoces, Gag et l'ARNg forment des clusters dans le cytoplasme tandis qu'aux temps PT tardifs on retrouve des clusters à la MP et dans les virus.

Condition	Coefficient de corrélation r de Pearson	*p* value entre la condition WT et les mutants	Significativité	Taille d'effet d	IC 95%	Magnitude
Gag-WT	0,63 ± 0,09	/	/	/	/	/
Gag-ΔNC	0,33 ± 0,10	$1,22.10^{-11}$	***	3,01	2,52 – 3,67	G
Gag-ΔZF1ΔZF2	0,37 ± 0,10	$1,44.10^{-11}$	***	2,68	2,03 – 3,68	G
Gag-F16A	0,54 ± 0,09	0,085	ns	0,84	0,37 – 1,41	M
Gag-W37A	0,44 ± 0,22	0,015	**	1,04	0,57 – 1,56	G
Gag-F16AW37A	0,37 ± 0,13	$9,72.10^{-10}$	***	2,23	1,83 – 2,83	G
Gag-H23C	0,55 ± 0,11	0,35	*	0,66	0,2 – 1,18	M
Gag-H44C	0,37 ± 0,10	$1,46.10^{-11}$	***	2,62	2,05 – 3,46	G
Gag-H23CH44C	0,38 ± 0,14	$8,16.10^{-8}$	***	1,94	1,48 – 2,55	G
Gag-G2A	0,60 ± 0,09	1	ns	0,14	-0,42 - 0,64	N
Gag-Δp6	0,67 ± 0,09	0,46	ns	0,62	0,14 -1,18	M
ARNg-ΔSL1	0,57 ± 0,08	0,754	ns	0,51	0,03 – 1,03	M
ARNg-ΔSL1ΔSL3	0,64 ± 0,07	0,999	ns	-0,24	-0,8 – 0,26	P

Table 4 : Analyse de la colocalisation entre Gag et l'ARNg du VIH-1 selon la région mutée. Les images de microscopie confocale sur cellules HeLa ont été utilisées pour déterminer les coefficients de corrélation r moyens selon Pearson, représentation d'une corrélation entre signaux fluorescents. Les données ont été obtenues de l'analyse de trente images de microscopie confocale pour chaque condition et obtenues de trois expériences indépendantes. Les coefficients de Pearson obtenus pour chaque mutant ont été statistiquement comparés avec la condition sauvage par un test t de Welch (ns : non significatif $p > 0.05$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$ *** : $p < 0.0005$) et un test d de Cohen (N : Négligeable, d<0,2 ; P : Petit, 0,2 < d <0,5 ; M : Moyen, 0,5 < d <0,9 , G : Grand, d > 0,9).

Pour répondre aux questions d'ultrastructure cellulaire et de formation de particules virales, nous avons donc utilisé la MET et des marquages avec des nanoparticules d'or comme décrit précédemment. Il est important de préciser qu'à l'inverse de la microscopie confocale où les phénotypes sont directement observables sur les cellules et sont choisis, la MET laisse une part de hasard dans la sélection des cellules positives. En effet, lors de l'observation des grilles de microscopie, toutes les cellules sont balayées jusqu'à la détection de billes d'or. Ensuite, les photographies sont prises et une analyse plus détaillée permet des définir la présence ou l'absence de clusters de Gag et de l'ARNg.

Comme nous l'observons dans la figure 36, à 12 h PT, les nanoparticules d'or de 6 nm (MCP-eGFP-NLS) sont principalement distribuées dans le noyau et dans le cytoplasme (MCP associée à l'ARNg) selon la cellule et le niveau d'expression. Les nanoparticules d'or de 10 nm (Gag) sont retrouvées essentiellement dans le cytoplasme (Figure 36 B, a). À chaque temps post-transfection, des regroupements de nanoparticules d'or de même taille ou des deux tailles sont détectés dans la cellule. L'échelle de l'image a été utilisée pour définir un cercle de 130 nm de diamètre similaire à celui des particules virales du VIH-1 (Figure 36 B, cercles colorés). Dans ces cercles, la présence d'au minimum une bille d'or de 10 nm et de deux billes d'or de 6 nm ont permis de définir un cluster, signe d'une colocalisation et d'une interaction probable de Gag avec l'ARNg. Les cercles mauves correspondent

à des clusters Gag-ARNg localisés dans le cytoplasme ou proches de la MP tandis que les cercles rouges représentent des clusters retrouvés dans les particules virales.

Ainsi, à 12 h PT, des regroupements de Gag et de l'ARNg ont été mis en évidence dans le cytoplasme, le plus souvent proches de la membrane nucléaire, rarement proches de la PM (Figure 36 B, a, inserts 1 et 2, flèches creuses). Peu de virus sont observés dans le milieu extracellulaire à ce temps, ce qui est en accord avec la faible quantité de virus produits à des temps précoces (Gousset et al., 2008; Hübner et al., 2007). De plus, quelques billes d'or de 10 nm et des clusters Gag-ARNg ont également été détectés dans le noyau, mais cette localisation est moins abondante que le cytoplasme. Cette observation est en accord avec une étude du groupe de Parent qui a décrit la présence de quelques complexes ribonucléoprotéiques avec l'ARNg du VIH-1 au niveau des sites de transcription (Tuffy et al., 2020).

À 24 h et 48 h PT, les billes d'or de 6 nm sont retrouvées dans le cytoplasme et au niveau de la MP (Figure 36 B, b et c). Les billes d'or de 10 nm sont détectées dans le cytoplasme et à la périphérie cellulaire dans des virus. À ces deux temps, des clusters Gag-ARNg ont également été retrouvées dans le cytoplasme (Figure 36 B, b, insert 3, flèche creuse), à la périphérie cellulaire (Figure 36 A, b, insert 4, flèche vide), dans des virus en cours de bourgeonnement (Figure 36 B, b, insert 4, flèche pleine), et dans des virus ayant bourgeonné (Figure 36 B, c, inserts 5 et 6, flèches pleines).

Ainsi, des complexes nucléoprotéiques sont donc détectés à chaque temps post-transfection, mais dans des localisations cellulaires différentes. Il est à noter que des différences sont observables entre les résultats obtenus par microscopie confocale et par MET. En effet, le confocal montre une colocalisation identique entre Gag et l'ARNg dans le cytoplasme aux différents temps tandis que la MET apporte une précision supplémentaire en démontrant une évolution de la localisation des clusters dans les cellules en direction de la MP. Cela est certainement dû à la différence de résolutions car le confocal est limité à 200-250 nm alors que nous nous sommes ici intéressés par des proximités d'objets d'environ 100-130 nm en accord avec la taille des virus. Ainsi, la présence d'une couleur jaune, significative d'une colocalisation, peut en fait correspondre à une détection de Gag et de l'ARNg qui sont finalement relativement éloignés à l'échelle d'un virus. Cela illustre parfaitement la complémentarité de ces deux approches, le confocal permettant de visualiser des phénotypes d'intérêt et la MET permettant d'obtenir des détails à haute résolution sur la formation des complexes entre Gag et l'ARNg.

En conclusion, nos résultats de MET suggèrent que le recrutement de l'ARNg du VIH-1 par Gag et la formation de complexes nucléoprotéiques débuterait dans le cytoplasme, ou dans le noyau mais dans une moindre mesure, puis ces complexes migreraient en direction de la MP où des molécules

supplémentaires de Gag seraient ajoutées pour finaliser l'assemblage et former de nouvelles particules virales.

3. Analyse quantitative des clusters Gag-ARNg

Une analyse quantitative des clusters formés par un regroupement de Gag et de l'ARNg a ensuite été réalisée à partir des images de MET. Tout d'abord, le nombre de clusters Gag-ARNg ainsi que leur distribution subcellulaire a été évalué grâce aux cercles de 130 nm décrits dans le paragraphe précèdent. Ceux-ci représentent une unité de base pour la détection des clusters Gag-ARNg. Pour chaque temps PT décrit ci-dessus, cinquante images de MET obtenues de trois expériences indépendantes ont été analysées.

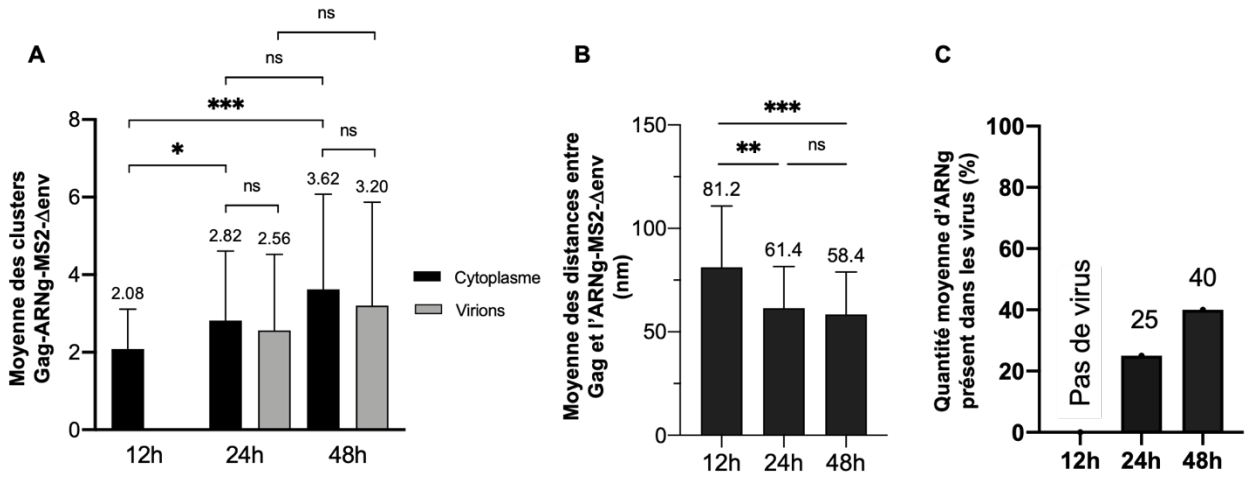


Figure 37 : Analyse des clusters Gag/ARNg et de l'encapsidation de l'ARNg en fonction du temps.
A) Histogramme représentant le dénombrement des clusters Gag-ARNg dans le cytoplasme de la cellule ou dans les virions à chaque temps PT d'après la figure 36 B. Les données représentent la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (SEM) compté sur cinquante cellules obtenues de trois expériences indépendantes. Les *p* values ont été obtenues par un test t de Welch pour comparer les moyennes (ns : non-significatif p>0,05 , * : p<0.05 , *** : p<0.0005). B) Histogramme représentant les distances moyennes entre Gag et l'ARNg dans chaque ROI par la mesure des distances moyennes entre chaque bille d'or de 10 nm et les billes d'or de 6 nm environnantes aux trois temps PT. La distribution des distances entre les billes d'or a été analysé bioinformatiquement comme décrit le matériel et méthodes. Les données représentent la moyenne des distances présentes dans les clusters de 90 cellules provenant de trois expériences indépendantes. Les p values ont été obtenues par un test t de Welch pour comparer les distances moyennes (ns : non-significatif *p*>0,05, ** : p<0.005 , *** : p<0.0005). Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. C) Histogramme représentant la quantité d'ARNg encapsidé dans les virus aux trois temps PT analysés.

À 12 h PT, 104 clusters ont été dénombrés dans le cytoplasme (Figure 36 B, insert 1), soit une moyenne de 2,08 +/- 1,03 clusters par image. À 24 h PT, 269 clusters ont été détectés, avec une moyenne de 5,38 +/- 2,84 clusters par image. Les clusters étaient répartis dans le cytoplasme à raison de 2,82 +/-

1,79 clusters par image en moyenne et dans les virus avec une moyenne de 2,56 +/- 1,96 (Figure 36 B, insert 4). À 48 h PT, 341 clusters ont été dénombrés, avec en moyenne 6,82 +/- 3,63 clusters par image, répartis entre le cytoplasme à raison de 3,62 +/- 2,46 clusters en moyenne et dans les virus avec 3,20 +/- 2,67 clusters en moyenne. Il est à noter qu'une augmentation significative du nombre de clusters a été observée en fonction du temps, soulignant une production augmentée de Gag et de l'ARNg, pouvant favoriser l'assemblage viral. Cependant, le ratio de clusters répartis entre le cytoplasme et les virus est similaire (Figure 37 A, comparer les barres noires et grises.)

La distance séparant Gag et l'ARNg dans les clusters a ensuite été déterminée sur les images de MET en collaboration avec Clovis Tauber (UMR INSERM U1253 iBrain, Tours), spécialiste du traitement des images. Les cercles de 130 nm de diamètre précédemment décrit ont été réutilisés pour réaliser l'analyse sur des régions d'intérêt (ROI, *Regions Of Interest*). Tout d'abord, la dynamique des images a été modifiée non-linéairement afin d'augmenter le contraste des billes. Les nanoparticules d'or ont été détectées grâce à une décomposition de l'image par transformée en ondelettes à trous suivie de l'utilisation d'une corrélation multi-échelle. Cette approche permet de détecter les billes tout en étant plus robuste aux bruits et aux textures locales (Olivo-Marin, 2002) et d'éliminer les spots de forme non circulaire. Les surfaces des billes ont ensuite été converties en leur diamètre équivalent puis séparées en deux classes en tenant compte de la taille des pixels et après analyse de leur distribution. Dans un second temps, la distance moyenne entre chaque bille d'or de 10 nm et les billes de 6 nm environnantes a été déterminée dans chaque ROI. Les distances moyennes entre Gag et l'ARNg dans les clusters ont été déterminées à chaque temps PT : 81,2 ± 29,7 nm à 12 h PT, 61,4 ± 20,2 nm à 24 h PT et 58,4 ± 20,5 nm à 48 h PT (Figure 37 B et Table 5). La distance entre Gag et l'ARNg diminue significativement entre 12 h et 24 h PT ($p < 0,005$) puis reste similaire entre 24h et 48 h PT ($p > 0,05$), ce qui suggère que les complexes nucléoprotéiques Gag-ARNg se condensent en fonction du temps puis se stabilisent lorsque le processus d'assemblage est terminé.

Condition	Distance moyenne entre Gag et l'ARNg dans les clusters (nm)	p value entre la condition WT et les mutants	Significativité	Taille d'effet d	IC 95%	Magnitude
Gag-WT	61,4 ± 20,2	/	/	/	/	/
Gag-ΔNC	93,9 ± 29,6	$3{,}62.10^{-5}$	***	1,28	0,84 / 1,82	G
Gag-ΔZF1ΔZF2	105,4 ± 35,2	$3{,}9.10^{-6}$	***	1,53	1,13 / 2,06	G
Gag-F16A	78,4 ± 32,9	0,037	*	0,62	0,26 / 0,95	M
Gag-W37A	98,2 ± 37,6	$6{,}01.10^{-11}$	***	1,22	0,92 / 1,55	G
Gag-F16AW37A	90,0 ± 37,1	$3{,}78.10^{-7}$	***	0,96	0,69 / 1,24	G
Gag-H23C	85,3 ± 35,4	$4{,}69.10^{-6}$	***	0,83	0,53 / 1,1	G
Gag-H44C	85,9 ± 37,2	$7{,}11.10^{-5}$	***	0,82	0,52 / 1,12	G
Gag-H23CH44C	83,3 ± 35,0	$8{,}74.10^{-7}$	***	0,88	0,59 / 1,17	G
Gag-G2A	51,7 ± 21,5	0,541	ns	0,47	0,03 / 1	P
Gag-Δp6	72,8 ± 26,3	0,234	ns	0,48	0,14 / 0,8	P
ARNg-ΔSL1	61,8 ± 27,1	1	ns	-0,015	-0,35 / 0,39	N
ARNg-ΔSL1ΔSL3	112,7 ± 39,0	$1{,}62.10^{-9}$	***	1,65	1,28 / 2,11	G

Table 5 : Analyse des clusters Gag-ARNg du VIH-1 selon la région mutée par mesure des distances entre Gag et l'ARNg. Les images de MET sur cellules HeLa ont été utilisées pour déterminer les distances entre Gag et l'ARNg. La table représente les distances moyennes mesurées entre chaque bille de 10 nm (Gag) et les billes de 6 nm (ARNg) environnantes dans chaque région d'intérêt déterminée. Les données ont été obtenues de l'analyse cinquante images de MET obtenues de trois expériences indépendantes. Les moyennes des distances obtenues pour chaque mutant ont été statistiquement comparées avec la condition sauvage par un test t de Welch (ns : non significatif $p > 0.05$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$ *** : $p < 0.0005$) et un test d de Cohen (N : Négligeable, d<0,2 ; P : Petit, 0,2 < d <0,5 ; M : Moyen, 0,5 < d <0,9 , G : Grand, d > 0,9).

Le ratio de particules virales contenant de l'ARNg (particules pleines sur vides) a également été déterminé (Figure 37 C et Table 6). À 12 h, trop peu de virus ayant bourgeonné à la PM ont été détectés pour effectuer ce calcul. À 24 h PT, parmi les cinquante images analysées, 515 virus ont été dénombrés et 25% d'entre eux étaient marqués avec billes d'or de 6 nm, suggérant qu'un quart des virus ont encapsidé de l'ARNg. L'absence d'ARNg marqué dans certains virus peut s'expliquer par la capacité de Gag à s'auto-assembler en encapsidant des ARN cellulaires qui ne sont pas détectés avec les conditions expérimentales utilisées dans ces travaux (Comas-Garcia et al., 2016). Cette absence d'ARNg peut également s'expliquer par un défaut technique étant donné que la protéine Gag n'est parfois détectée uniquement par sa forme en VLP. Les épitopes de la protéine MCP-eGFP-NLS peuvent également être masqués selon le plan de coupe et donc inaccessibles aux anticorps. Malgré cela, ce rapport de particules virales pleines sur vides démontre tout de même qu'une faible proportion de Gag encapside de l'ARNg, ce qui est en accord avec les observations de microscopie confocale, où la membrane plasmique présente toujours beaucoup plus de signaux fluorescents rouges correspondant à Gag que de signaux fluorescents verts correspondant à l'ARNg (Figure 36A).

À 48 h PT, parmi les cinquante images analysées, 597 virus ont été dénombrés, signifiant une augmentation nette du nombre de particules virales libérées dans le milieu extracellulaire (Figure 36 B, comparer les images b et c) et 40% d'entre eux contiennent de l'ARNg (Figure 37 C et Table 6). Ainsi, le ratio de particules virales pleines par rapport à celles vides augmente notablement entre 24 h et 48 h. Ce résultat suggère qu'une encapsidation spécifique de l'ARNg est favorisée par le temps d'expression des composants viraux, probablement du fait d'une augmentation de la quantité de Gag et d'ARN ce qui facilite la formation des complexes nucléoprotéiques.

Condition	Quantité d'ARNg encapsidé dans les virus (%)
Gag-WT 12h	Aucun virus
Gag-WT 24h	25
Gag-WT 48h	40
Gag-ΔNC	Virus sans ARNg
Gag-ΔZF1ΔZF2	Virus sans ARNg
Gag-F16A	18
Gag-W37A	9
Gag-F16AW37A	14
Gag-H23C	22
Gag-H44C	14
Gag-H23CH44C	Peu de virus ou retenus à la MP
Gag-G2A	Aucun virus
Gag-Δp6	Peu de virus ou retenus à la MP
ARNg -ΔSL1	36
ARNg -ΔSL1ΔSL3	16

Table 6 : Évaluation de l'encapsidation de l'ARNg dans les particules virales. Les images de MET sur cellules HeLa ont été utilisées pour déterminer la quantité de particules virales contenant des billes d'or de 6 nm. La table représente une estimation du pourcentage de virus contenant de l'ARNg. Les données ont été obtenues de l'analyse de trente images de MET obtenues de trois expériences indépendantes.

4. Détection de Gag et de l'ARNg par une autre technique

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les paragraphes précédents, nous avons évalué la localisation de l'ARNg grâce à l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). Cette technique permet de s'affranchir des protéines MCP-eGFP-NLS et des tiges-boucles MS2 incluses dans l'ARNg. Les cellules HeLa transfectées avec un plasmide pNL4.3 exprimant l'ARNg ont été analysées par immunofluorescence et FISH 24 h après la transfection. Gag est détectée avec un anti-p24 comme précédemment. L'ARNg a été détecté grâce l'emploi de sondes couplées à la biotine, elle-même révélée par de la streptavidine couplée à un fluorophore de 650 nm. À l'inverse des paragraphes précédents, la protéine Gag est détectée par un signal fluorescent vert tandis que l'ARNg est détecté par un signal fluorescent rouge. L'absence de signal dans le contrôle montre la spécificité de notre système de détection de Gag et de l'ARNg (Figure 38 A). Dans le cadre d'une transfection des cellules

HeLa avec le plasmide pNL4.3, Gag est retrouvé majoritairement accumulé au niveau de la MP et sous forme de spots fluorescents tandis que l'ARNg est plutôt diffus dans le cytoplasme avec une légère accumulation à la MP. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans le cadre de l'ARNg contenant les tiges-boucles MS2, ce qui confirme que la technique utilisée n'a pas d'impact sur les phénotypes observés et l'expression de Gag et de l'ARNg. Des zones de colocalisation de Gag et de l'ARNg sont détectées dans le cytoplasme sous formes de spots, confirmant la détection de complexes entre Gag et l'ARNg dans un contexte de virus complet (Figure 38 B). Inversement, très peu de spots de colocalisation de Gag et de l'ARNg sont observés au niveau de la MP, ce qui est en accord avec la présence de 75% de particules virales ne contenant pas d'ARNg dans la partie 1. Le même phénotype est retrouvé lorsque les cellules expriment le plasmide pNL4.3-MCP-Δenv utilisé dans la partie 1 (Figure 38 C), soulignant la non-implication de l'enveloppe virale dans la colocalisation de Gag et de l'ARNg.

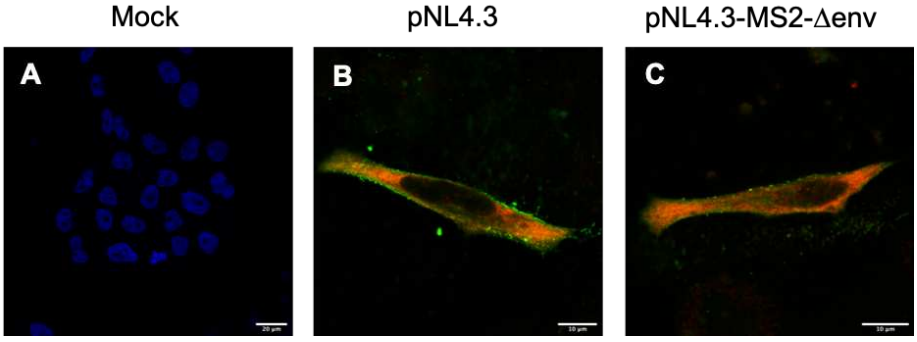


Figure 38 : Détection de la protéine Gag et de l'ARNg du VIH-1 dans les cellules HeLa par FISH.
La cellules HeLa sont non-transfectées (A), transfectées avec le plasmide pNL4.3 (B) ou transfectées avec le plasmide pNL4.3-Δenv-MS2 (C). Le noyau est détecté en bleu par le DAPI. La protéine Gag est détectée par la fluorescence verte et l'ARNg par la fluorescence rouge.

Ensuite, l'hybridation *in situ* a été utilisée en MET pour détecter l'ARNg dans le cadre d'une transfection des cellules HeLa avec le plasmide pNL4.3. La protéine Gag n'est pas marquée car détectée par la formation de VLP. L'ARNg a été détecté comme précédemment mais avec l'emploi streptavidine couplée à des nanoparticules d'or de 6 nm de diamètre. L'ARNg est détecté dans le cytoplasme des cellules HeLa mais également dans des particules virales en cours de bourgeonnement (Figure 39). Par MET, peu de virus contiennent de l'ARNg tandis que les reste des particules virales semblent vides. Cette observation va également dans le sens des chiffres obtenus précédemment, où seulement un quart des virus contiennent de l'ARNg (Table 6).
Il est ainsi possible de conclure que la détection de Gag et de l'ARNg est indépendante de la technique utilisée et de l'ajout des tiges-boucles MS2 dans l'ARNg. Le système MS2 est plus facilement

utilisable en terme technique par MET et permet d'étudier l'effet de mutations de Gag, c'est pour cette raison que nous avons continué notre étude en l'employant.

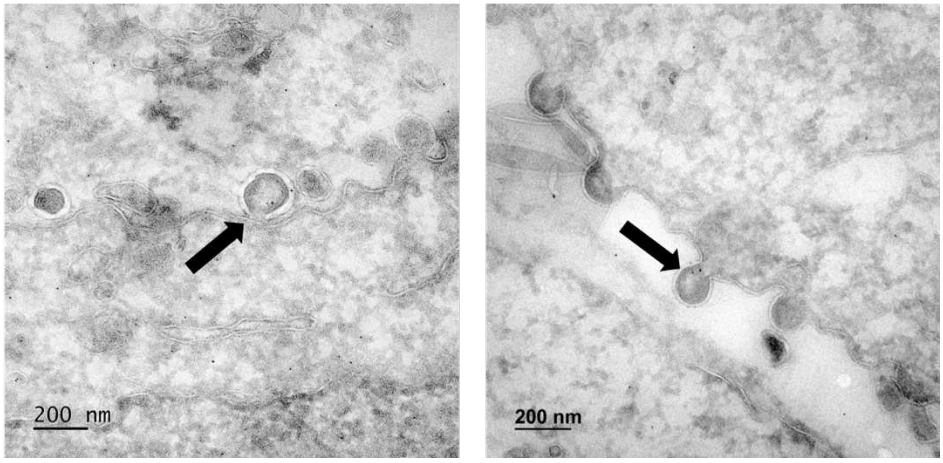


Figure 39 : Détection de l'ARNg du VIH-1 dans les cellules HeLa par hybridation *in situ* en MET.
Les cellules HeLa transfectées avec la souche pNL4.3 ont été traitées par la technique Tokuyasu. L'ARNg du VIH-1 est détecté grâce à de la streptavidine couplée à des nanoparticules d'or de 6 nm (flèches noires pleines).

5. Étude du lien entre formation des clusters Gag-ARNg et la liaison de Gag à la membrane plasmique

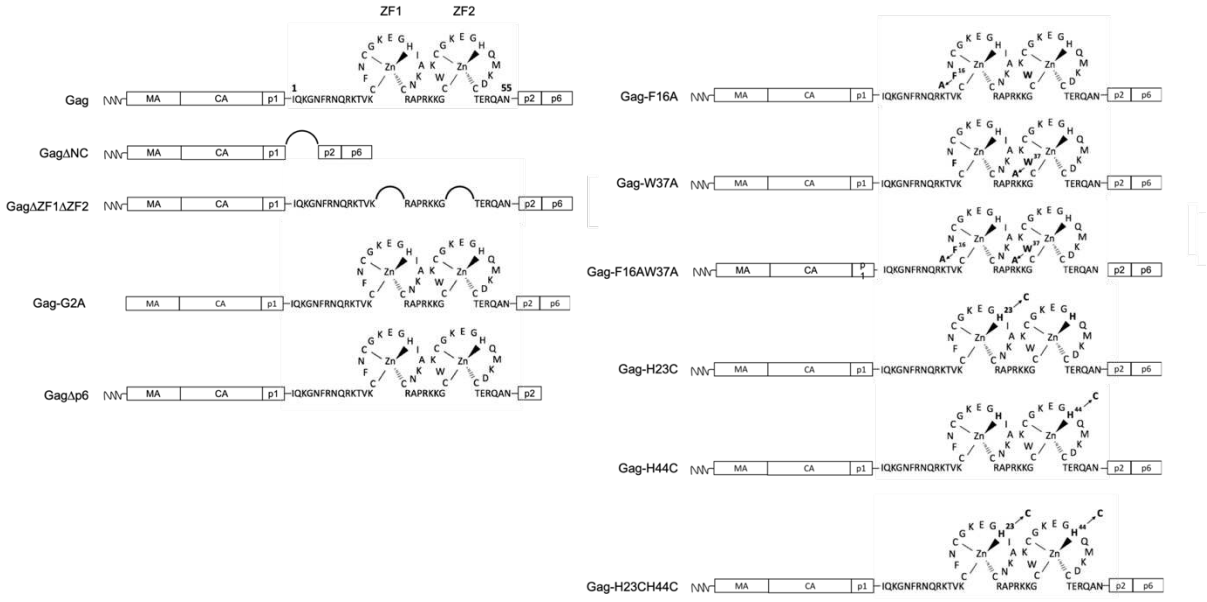


Figure 40 : Représentation des constructions de la protéine Gag sauvages et mutées utilisées dans cette étude.
Le plasmide pNL4.3-MS2-Δenv a été muté au niveau du gène *gag*. Les domaines de la protéine Gag du VIH-1 sont représentés par des carrés vides tandis que le domaine NC est représenté par sa séquence primaire, contenant deux doigts de zinc. La délétion de chaque domaine est symbolisée par un pont liant les séquences. Les substitutions sont désignées par la position du résidu modifié et du résidu remplaçant.

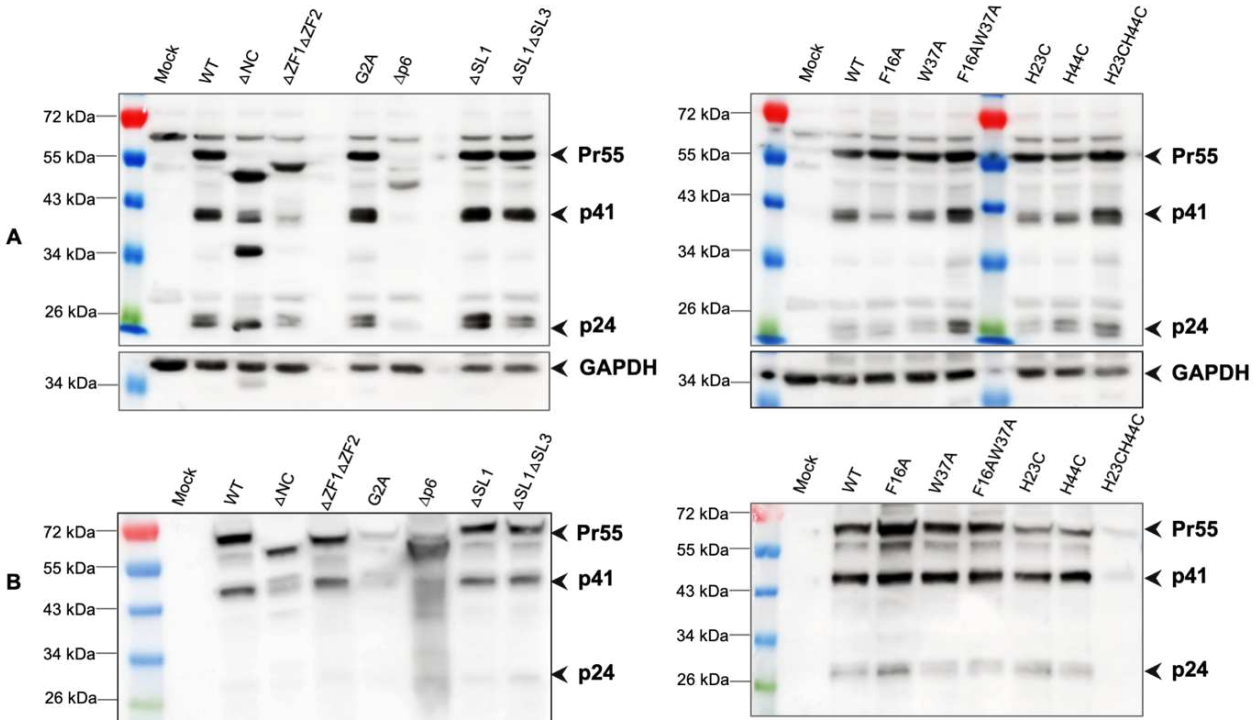


Figure 41 : Niveau d'expression intracellulaire et extracellulaire de la protéine Gag et de ses dérivés.
Les cellules HeLa ont été transfectées transitoirement avec un plasmide pNL4.3-MS2-Δenv exprimant soit les protéines Gag sauvages ou mutantes puis l'expression de Gag intracellulaire (A) ou extracellulaire (B) a été analysée par Western Blot 24h PT. Gag est détectée avec un anticorps anti VIH-1 p24 (panel du haut). Les différentes formes de maturation de Gag sont annotées. La protéine GAPDH est utilisée comme gène de ménage (panel du bas).

Pour confirmer que les clusters Gag-ARNg se forment bien dans le cytoplasme de la cellule, la glycine en position 2 de Gag a été remplacée par une alanine (Gag-G2A, Figure 40). Ce mutant empêche Gag d'être myristoylé et de s'ancrer dans le feuillet interne de la MP. La protéine virale perd donc sa capacité à s'accumuler à la MP et ne peut plus bourgeonner (Gottlinger et al., 1989). Tout d'abord, la production de ce mutant dans les lysats et surnageants des cellules HeLa a été vérifiée par Western Blot 24 h PT. Gag-G2A est produite en quantité similaire par rapport à Gag-WT dans les cellules HeLa (Figure 41 A, gel de gauche). En revanche, comme attendu, Gag-G2A n'est pas retrouvée dans le surnageant, étant donné que ce mutant ne forme pas de particules virales (Figure 41 B, gel de gauche). En microscopie confocale, on notera une absence de Gag à la MP avec Gag-G2A et l'ARNg colocalisés dans le cytoplasme des cellules (Figure 42 A), comme cela est confirmé par un coefficient r de 0,60 +/- 0,09 (Table 4).

Pour comparer les mutants à la condition sauvage, deux tests statistiques ont été utilisés : le test t de Welch avec une interprétation basée sur la p value et le test d de Cohen avec une interprétation basée sur la taille d'effet et l'intervalle de confiance à 95% (IC95). La taille d'effet représente la mesure de la force de l'effet d'une variable sur une autre. Plus la taille d'effet est petite et plus la force d'une

variable sur l'autre est minime. Inversement, plus la taille d'effet est grande, plus la force d'une variable sur l'autre est importante. La magnitude permet de seuiller la taille d'effet. L'intervalle de confiance permet de donner une estimation de l'incertitude que l'on a sur la vraie valeur du paramètre à estimer. Plus l'IC95 est restreint, plus l'estimation est fiable. Pour le mutant G2A, la p value n'est pas statistiquement significative (>0,05), la taille d'effet est faible (0,14) et l'IC95 est restreint, donnant une magnitude négligeable (Table 4). Le mutant Gag-G2A n'est donc statistiquement pas différent de Gag-WT. Il est tout de même à noter que Gag-WT et Gag-G2A présentent des différences de localisation, ne permettant pas de strictement comparer les coefficients r. En effet, Gag-WT est exprimée dans le cytoplasme et à la MP tandis que Gag-G2A est exprimée uniquement dans le cytoplasme.

En MET, plusieurs clusters Gag-G2A-ARNg sont détectés uniquement dans le cytoplasme et aucun virus n'est détecté à la PM (Figure 42 B, inserts 1 et 2). La distance moyenne entre Gag-G2A et l'ARNg est de 51,66 nm, ce qui est statistiquement identique à la valeur obtenue pour Gag-WT (Table 5). Ces résultats indiquent que la formation des complexes Gag-ARNg se produit bien dans le cytoplasme de manière indépendante de l'ancrage de Gag dans la MP, ce qui est en accord avec ce qui avait été précédemment observé par d'autres équipes (Boutant et al., 2020; Hendrix et al., 2015; Jouvenet et al., 2009).

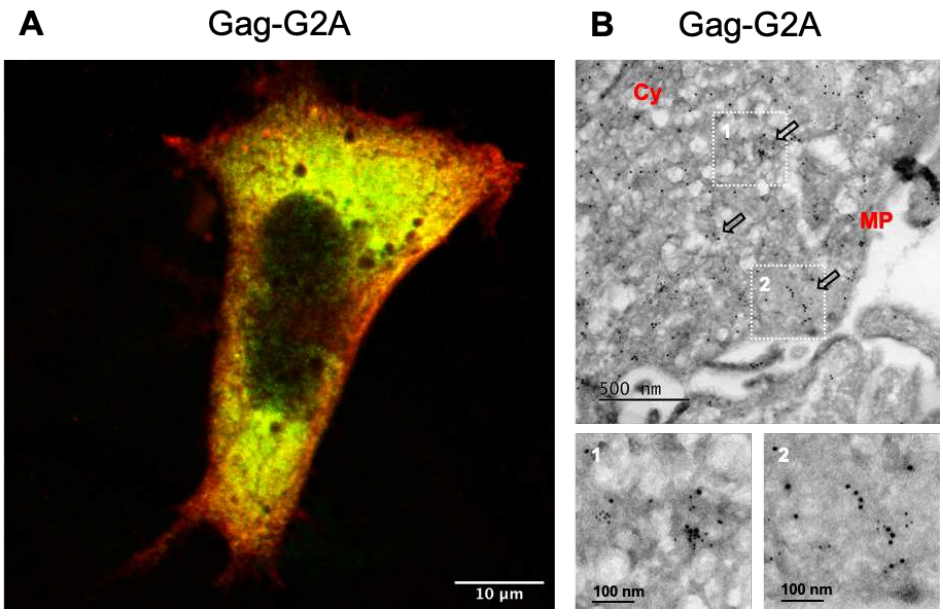


Figure 42 : Visualisation de la colocalisation entre Gag-G2A et ARNg par microscopie confocale et des clusters formés par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec un plasmide modifié pNL4.3-MS2-Δenv exprimant Gag-G2A et l'ARNg et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

6. Étude de l'implication du domaine NC dans la formation des clusters Gag-ARNg

Afin d'étudier par MET le mécanisme de formation des clusters Gag-ARNg, le domaine NC et les doigts de zinc ont été délétés (Figure 40). La délétion du domaine NC ou des deux ZF abolit l'interaction entre Gag et l'ARNg (Boutant et al., 2020; Grigorov et al., 2007; Hendrix et al., 2015). Les deux formes tronquées de Gag sont exprimées de manière équivalente dans les lysats des cellules HeLa (Figure 41 A, gel de gauche) même si Gag-ΔNC est plus maturée que Gag-ΔZF1ΔZF2. Dans les virus, Gag-ΔNC est deux fois moins abondant que Gag-WT tandis que Gag-ΔZF1ΔZF2 y est peu détecté (Figure 41 B, gel de gauche). La raison pour laquelle Gag-ΔZF1ΔZF2 n'est pas maturée reste énigmatique mais l'absence de virus dans le surnageant quand la maturation de Gag est impactée a déjà été reporté (Huang et al., 1995; Kaplan et al., 1993; Pettit et al., 1994).

Par microscopie confocale, Gag-ΔNC et Gag-ΔZF1ΔZF2 sont observées à la MP et diffuses dans le cytoplasme tandis que l'ARNg est essentiellement localisé dans le cytoplasme (Figure 43 A et B, images de gauche), ce qui est en accord avec d'autres études ayant reporté les mêmes phénomènes (Boutant et al., 2020; Grigorov et al., 2007; Hendrix et al., 2015). Pour ces mutants Gag-ΔNC et Gag-ΔZF1ΔZF2, les coefficients r sont de 0,33 +/- 0,10 et 0,37 +/- 0,10 respectivement (Table 4), ce qui est statistiquement très différent de Gag-WT. Ces résultats soulignent parfaitement l'absence de colocalisation entre l'ARNg et ces formes de Gag mutées.

Par MET, ces deux formes de Gag se retrouvent distribuées de façon équivalente dans le cytoplasme et ne forment pas de clusters avec l'ARNg (Figure 43, images de droite et inserts 1 et 3). En accord avec l'analyse des surnageants cellulaires en Western Blot (Figure 41, gels de gauche), des virus dépourvus d'ARNg sont observés pour Gag-ΔNC (Figure 43 A, inserts 1 et 2) mais pas pour Gag-ΔZF1ΔZF2, où des protrusions membranaires sont observées (Figure 43 B, insert 3) en accord avec d'autres études (Grigorov et al., 2007; Hogue et al., 2009). La distance moyenne entre chaque protéine Gag mutante et l'ARNg est de 93,9 +/- 29,6 nm et 105,4 +/-35,2 nm pour Gag-ΔNC et Gag-ΔZF1ΔZF2 respectivement, ce qui est statistiquement différent de la distance moyenne obtenue pour Gag-WT (Table 5). Ces résultats confirment que le domaine NC et les doigts de zinc sont essentiels pour le recrutement de l'ARNg par Gag dans le cytoplasme.

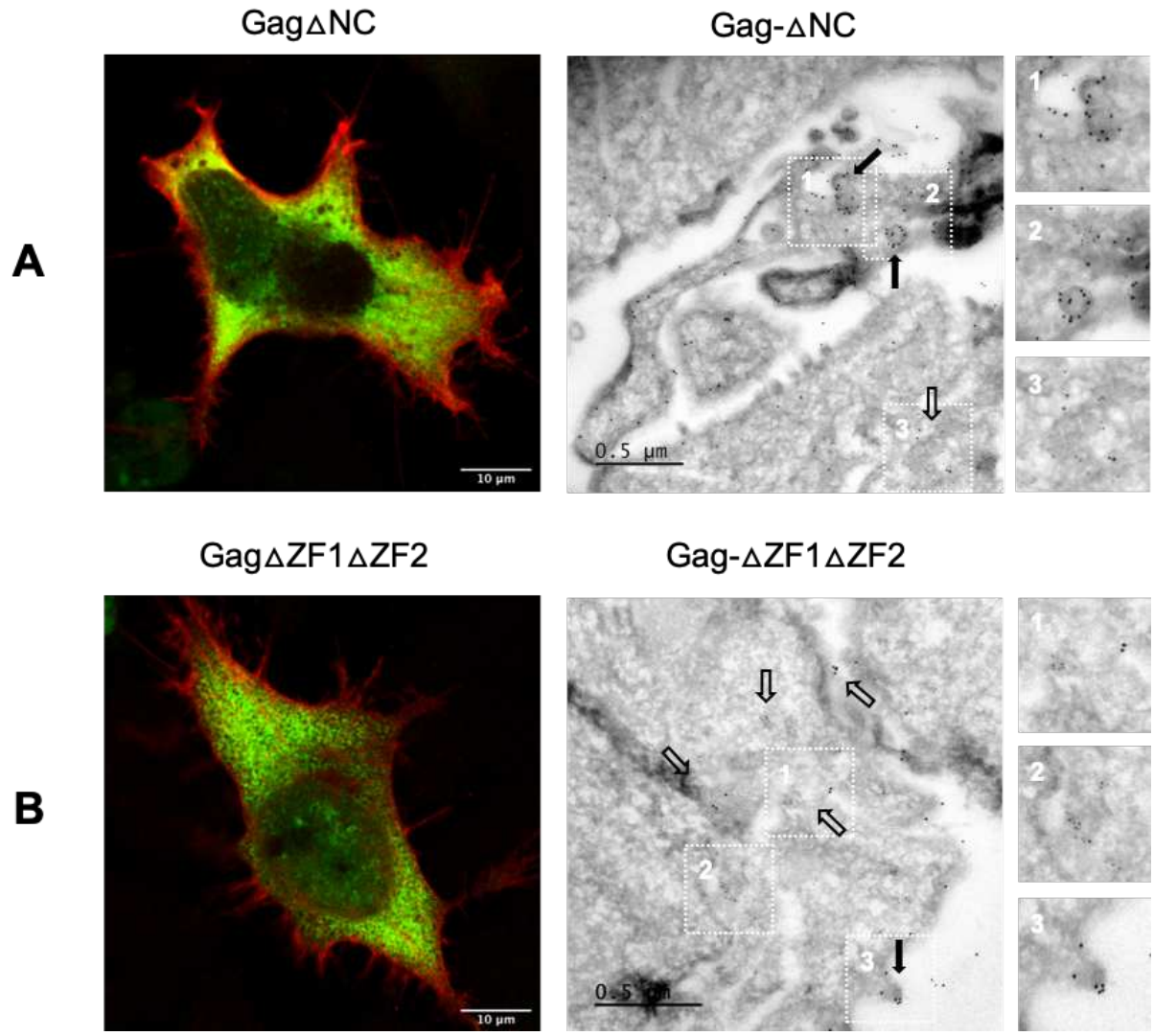


Figure 43 : Impact de la délétion du domaine NC ou des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les plasmides modifiés pNL4.3-MS2-Δenv codant pour Gag-ΔNC (A) ou Gag-ΔZF1ΔZF2 (B) et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0.6/0.4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

7. Étude de l'implication des résidus aromatiques des doigts de zinc de la NC dans la formation des clusters Gag-ARNg

Plusieurs études de RMN réalisées sur le complexe formé de la protéine NCp7 et des oligonucléotides ont mis en avant des résidus impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'ARNg. Parmi eux, les résidus aromatiques phénylalanine 16 (F16) et tryptophane 37 (W37) localisés respectivement sur le premier et second doigt de zinc, mais spatialement proches dans la structure de la protéine, leur permet de s'intercaler dans les bases des oligonucléotides (Bazzi et al., 2011; De Guzman, 1998; Morellet et al., 1998). Des constructions pNL4.3-MS2-Δenv arborant les mutations F16A, W37A ou F16AW37A

ont ainsi été réalisées (Figure 40). Ces mutants de Gag sont exprimés de façon similaire dans les lysats et surnageants cellulaires en comparaison de Gag-WT (Figure 41, gels de droite).

La détection de ces mutants par microscopie confocale montre que Gag est diffus dans le cytoplasme et s'accumule à la MP (Figure 44, images de gauche). Le phénotype observé pour Gag-F16A semble plus proche de celui observé pour Gag-WT, c'est à dire une colocalisation cytoplasmique entre Gag mutée et l'ARNg (comparer Figure 44 A et Figure 36 A). En effet, le coefficient de corrélation r est de 0,54 +/- 0,09 pour Gag-F16A, ce qui est proche de la valeur de la condition sauvage et statistiquement peu différent (Table 4) ($p = 0,085$; taille d'effet 0,84). Inversement, les profils de fluorescence de Gag-W37A et de Gag-F16AW37A et de l'ARNg semblent plus proches de ceux observés pour le mutant Gag-ΔNC. Leurs coefficients de corrélation r sont de 0,44 +/- 0,22 pour Gag-W37A et de 0,40 +/- 0,13 pour Gag-F16AW37A, ce qui est statistiquement différent de la condition sauvage (Table 4).

En MET, Gag-F16A, Gag-W37A et Gag-F16AW37A sont retrouvées dans le cytoplasme et assemblées dans les virus à la MP (Figure 44, images de droite). Les distances moyennes entre ces mutants de Gag et l'ARNg sont de 78,4 nm pour Gag-F16A, 98,2 nm pour Gag-W37A et 90,0 nm pour Gag-F16AW37A (Table 5). Les distances pour les mutants Gag-W37A et Gag-F16AW37A sont statistiquement différentes de Gag-WT tandis que le mutant Gag-F16A est statistiquement peu différent de Gag-WT. L'analyse de ces mutants révèle également que le ratio de particules virales contenant de l'ARNg chute à 18% pour Gag-F16A, à 9% pour Gag-W37A et à 14% pour Gag-F16AW37A ce qui est beaucoup plus faible que pour Gag-WT (25%) (Table 6). Le coefficient r, les distances entre Gag et l'ARNg ainsi que le ratio de particules virales vides sur pleines obtenus pour le mutant Gag-W37A montrent un effet significativement plus important que pour le mutant Gag-F16A, soulignant l'implication différentielle des résidus aromatiques des deux doigts de zinc dans le recrutement de l'ARNg. Les valeurs obtenues sont signes d'une diminution de la colocalisation et d'une augmentation de la distance. Les résidus aromatiques des doigts de zinc possèdent donc un rôle clé dans la formation de clusters Gag-ARNg et leur seule mutation semble responsable d'un défaut dans le recrutement de l'ARNg par la protéine Gag.

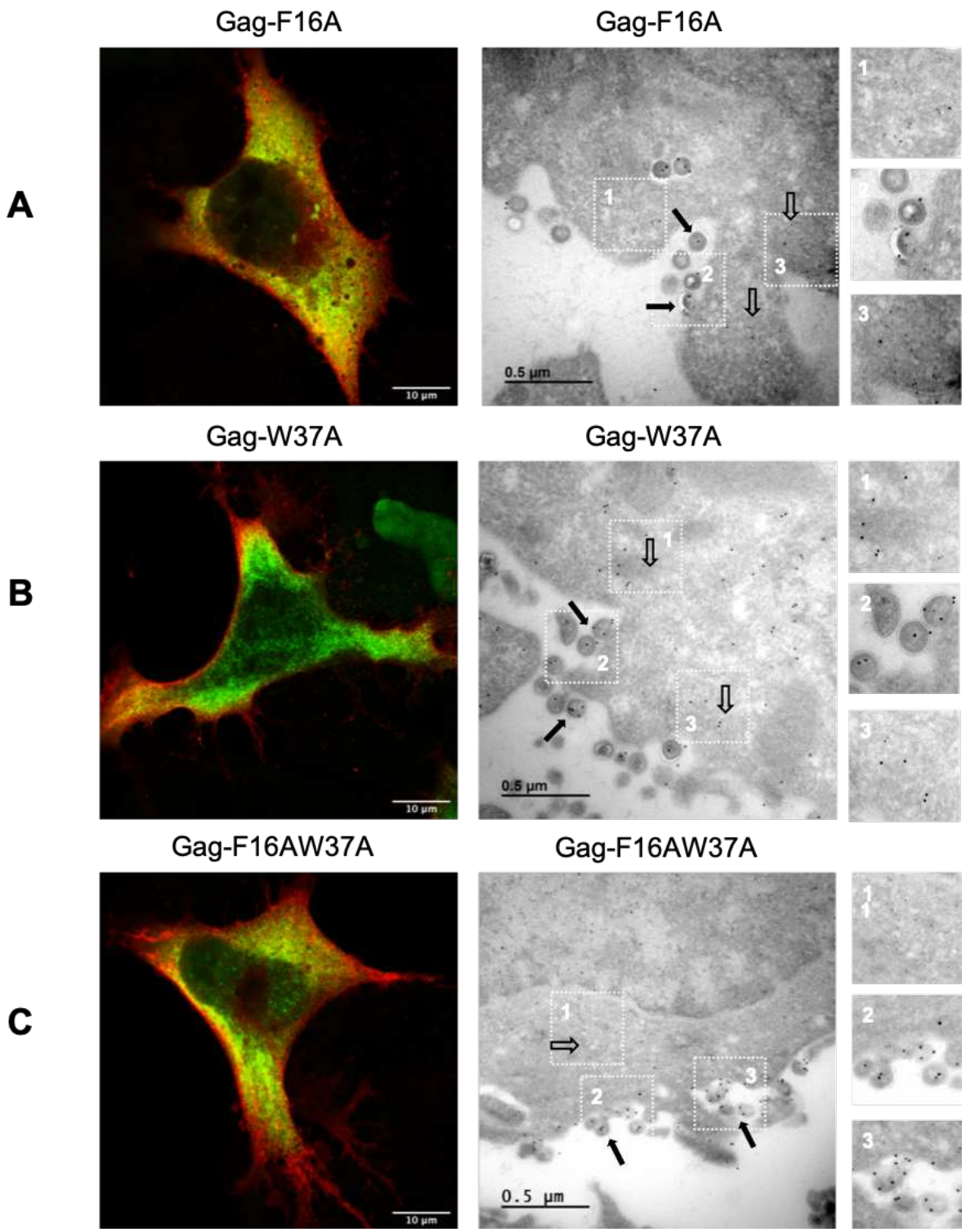


Figure 44 : Impact des mutations des résidus aromatiques des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les plasmides modifiés pNL4.3-MS2-Δenv codant pour Gag-F16A (A), Gag-W37A (B) ou Gag-F16AW37A (C) et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

8. Étude de l'implication de la structure des doigts de zinc de la NC dans la formation des clusters Gag-ARNg

Afin d'examiner l'influence de la structure des doigts de zinc sur la formation des clusters Gag-ARNg, des mutants de Gag ont été générés où les ligands du zinc, les histidines 23 et 44 ont été changés en cystéines (Figure 40). Ces substitutions n'affectent pas l'affinité de la NC pour le zinc mais modifient sa structure, induisant ainsi un éloignement spatial entre les deux doigts de zinc (Demene et al., 1994). Ces substitutions diminuent l'activité chaperonne de la NC *in vitro* (Guo et al., 2002), la synthèse d'ADN viral lors de la transcription inverse (Buckman et al., 2003; Didierlaurent et al., 2008; Tanchou et al., 1998) ainsi que la quantité d'ARNg encapsidé (Tanchou et al., 1998), aboutissant à la formation de particules virales non-infectieuses (Aldovini and Young, 1990; Gorelick et al., 1999; Grigorov et al., 2007; Guo et al., 2002; Tanchou et al., 1998). Les analyses par Western Blot montrent que les mutants Gag-H23C, Gag-H44C et Gag-H23CH44C sont exprimés de la même façon dans les lysats cellulaires et maturés par la protéase virale comme Gag-WT (Figure 41 A, gel de droite). Les mutants Gag-H23C et Gag-H44C sont libérés efficacement dans le milieu extracellulaire tandis que le double mutant Gag-H23CH44C est très faiblement exprimé dans les surnageants (Figure 41 B, gel de gauche), ce qui est en accord avec une étude précédente observant seulement 2% de libération virale pour ce mutant (Didierlaurent et al., 2008). En microscopie confocale, une diffusion de Gag et de l'ARNg est observée dans le cytoplasme, avec une accumulation de Gag à la MP (Figure 45, images de gauche). Le mutant Gag-H23C semble présenter une colocalisation avec l'ARNg, proche de Gag-WT, tandis que les mutants Gag-H44C et Gag-H23CH44C ne semblent pas être colocalisés avec l'ARNg. En effet, les coefficients de corrélation r sont de 0,55 +/- 0,11 pour Gag-H23C, 0,37 +/- 0,10 pour Gag-H44C et 0,38 +/- 0,14 pour Gag-H23CH44C (Table 4), ce qui confirme la plus forte colocalisation observée pour Gag-H23C mentionnées ci-dessus. Les valeurs obtenues pour Gag-H44C et Gag-H23CH44C sont statistiquement très différentes de Gag-WT tandis que la valeur obtenue pour Gag-H23C est statistiquement peu différente de Gag-WT.

Par MET, les protéines Gag-H23C, Gag-H44C et Gag-H23CH44C sont diffuses dans le cytoplasme (Figure 45, images de droite). Les constructions Gag-H23C et Gag-H44C sont capables de former des particules virales (Figure 45 A, inserts 1 et 3 ; Figure 45 B, inserts 1 et 2) tandis que peu de virus sont observés pour Gag-H23CH44C, la plupart retenus à la MP (Figure 45 C, inserts 2 et 3). De plus, les clusters formés entre l'ARNg et ces protéines Gag mutantes ont des distances moyennes de 85,3 nm pour Gag-H23C, 85,9 nm pour Gag-H44C et 83,2 nm pour Gag-H23CH44C, qui sont toutes statistiquement très différentes de Gag-WT (Table 5). À l'inverse des mutations des résidus aromatiques, les valeurs de distances obtenues pour les mutants des histidines ne sont pas différentes entre elles. Les niveaux d'encapsidation de l'ARNg dans les virions sont de 22% et de 14% pour Gag-

H23C et Gag-H44C respectivement (Table 6). Le taux d'ARNg encapsidé pour le mutant Gag-H23CH44C ne peut pas être évalué car trop peu de particules virales sont formées pour ce mutant.
Ces résultats démontrent que la structure des doigts de zinc à un impact important sur la formation de clusters Gag-ARNg et dans l'encapsidation de l'ARNg par la protéine Gag. Il est probable que les deux résidus aromatiques décrits ci-dessus et en conséquence le plateau hydrophobe assuré par la proximité spatiale des doigts n'adopte pas la bonne conformation malgré la flexibilité du domaine RAPRKK. Une étude structurale par RMN de ce type de mutant en interaction avec un oligonucléotide permettrait de répondre à cette hypothèse. Par ailleurs, à l'instar des résultats obtenus avec F16 et W37, il semble que la mutation sur le second doigt de zinc (H44) entraine une absence plus prononcée de colocalisation entre Gag et l'ARNg ainsi qu'un ratio plus faible de particules virales pleines sur vides en comparaison avec les mutations présentes sur le premier doigt de zinc (H23). Le second doigt de zinc du domaine NC semble donc plus impliqué dans le recrutement de l'ARNg par Gag et dans le processus d'encapsidation.

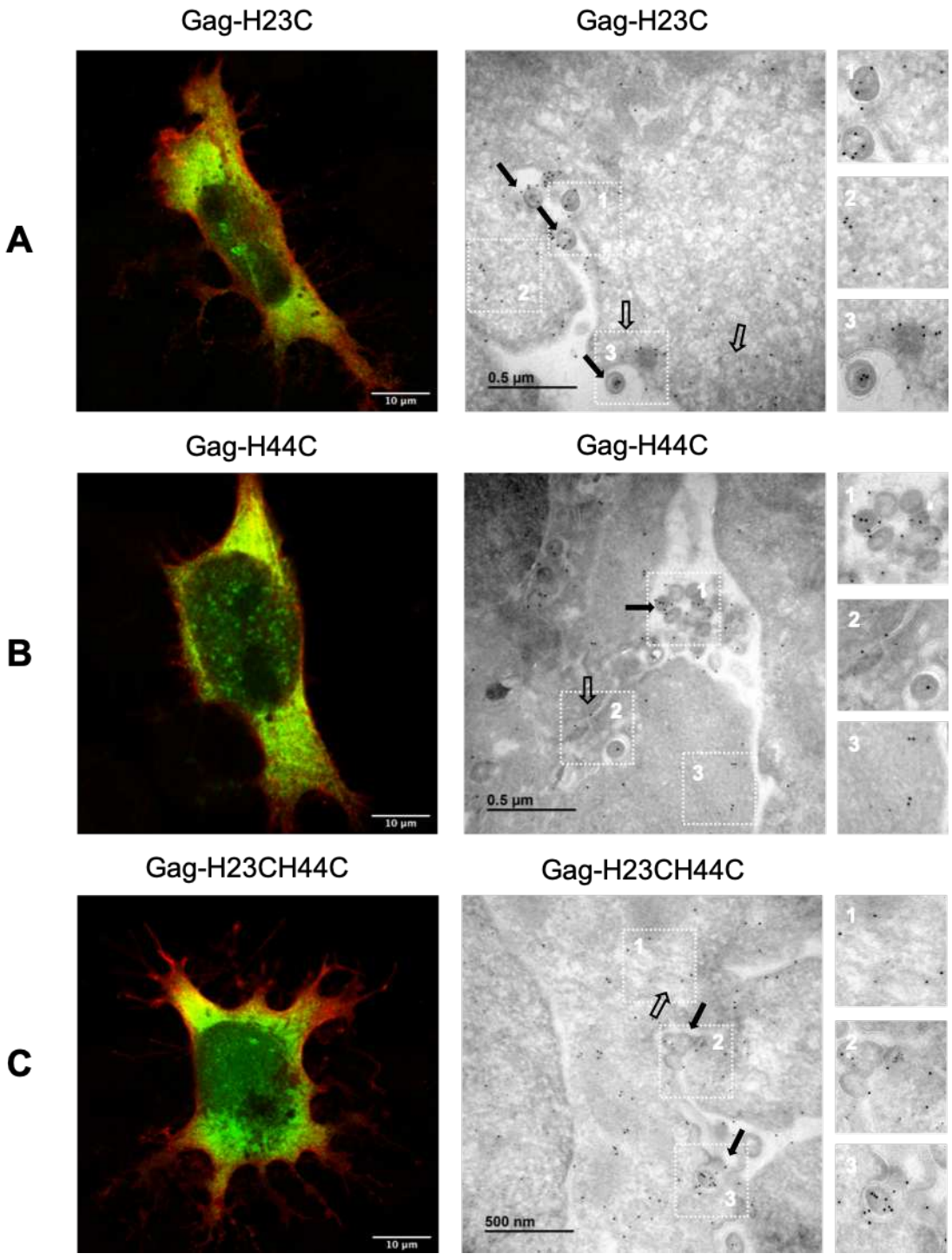


Figure 45 : Impact des mutations des résidus histidines des ZF sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les plasmides modifiés pNL4.3-MS2-Δenv codant pour Gag-H23C (A), Gag-H44C (B) ou Gag-H23CH44C (C) et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

9. Étude du lien entre la formation des clusters Gag-ARNg et le recrutement de la machinerie ESCRT par le domaine p6 de Gag

Des études de NMR et des expériences de liaison des ARN basés sur la NCp15 (NCp7, p2 et p6) ont montré que les domaines p2 et p6, bien que non impliqués directement dans la liaison des ARN, peuvent moduler les propriétés du domaine NC avec les acides nucléiques (Tanwar et al., 2017; Wang et al., 2014). De plus, des expériences biochimiques et biophysiques récentes menées sur la protéine Gag-Δp6 ont proposé un rôle pour le domaine p6 dans la spécificité de reconnaissance et d'interaction Gag-ARNg (Dubois et al., 2018). Cependant, le groupe de Musier-Forsyth a montré que Gag-Δp6 interagissait fortement avec le domaine Psi de l'ARNg (Sarni et al., 2020). Ces observations nous ont amené à évaluer la contribution de Gag délété du domaine p6 dans la formation des complexes Gag-ARNg (Figure 40). Par Western-Blot, Gag-Δp6 est produit en quantité plus faible dans les lysats cellulaires que Gag-WT (Figure 38A, gel de gauche). Dans les surnageants cellulaires, Gag-Δp6 est aussi retrouvé (Figure 41 B, gel de gauche) et pourrait correspondre à des protéines libres plutôt qu'à des protéines associées au virions (Huang et al., 1995; Sarni et al., 2020). En microscopie confocale, Gag-Δp6 est fortement colocalisée avec l'ARNg dans le cytoplasme cellulaire (Figure 42, image de gauche), comme l'illustre bien le coefficient de corrélation r qui est de 0,67 +/- 0,09 statistiquement proche de Gag-WT (Table 4). Par MET, des particules virales complètes sont retrouvées accrochées à la MP (Figure 46, image de droite, inserts 1 et 3), en accord avec le fait que Gag-Δp6 est incapable de recruter la machinerie ESCRT pour le bourgeonnement des particules virales à la MP (Freed, 2003; Rose et al., 2020). Plusieurs clusters Gag-ARNg sont observés dans le cytoplasme (Figure 46, image de droite, insert 2) et dans les virions retenus à la MP (Figure 46, image de droite, insert 3). La distance moyenne entre Gag-Δp6 et l'ARNg est de 72,8 nm, ce qui est similaire à la valeur obtenue pour Gag-WT (Table 5). Le taux d'ARNg encapsidé pour le mutant Gag-Δp6 ne peut pas être évalué car trop peu de particules virales sont formées pour ce mutant. Le mutant Gag-Δp6 est donc similaire à Gag-WT par confocal. En revanche les distances sont légérement plus élevées pour Gag-Δp6, ce qui est statistiquement peu différent de la condition sauvage. En conclusion, le processus de formation de complexes nucléoprotéiques entre Gag et l'ARNg semble indépendant du bourgeonnement viral et du recrutement de la machinerie ESCRT par le domaine p6.

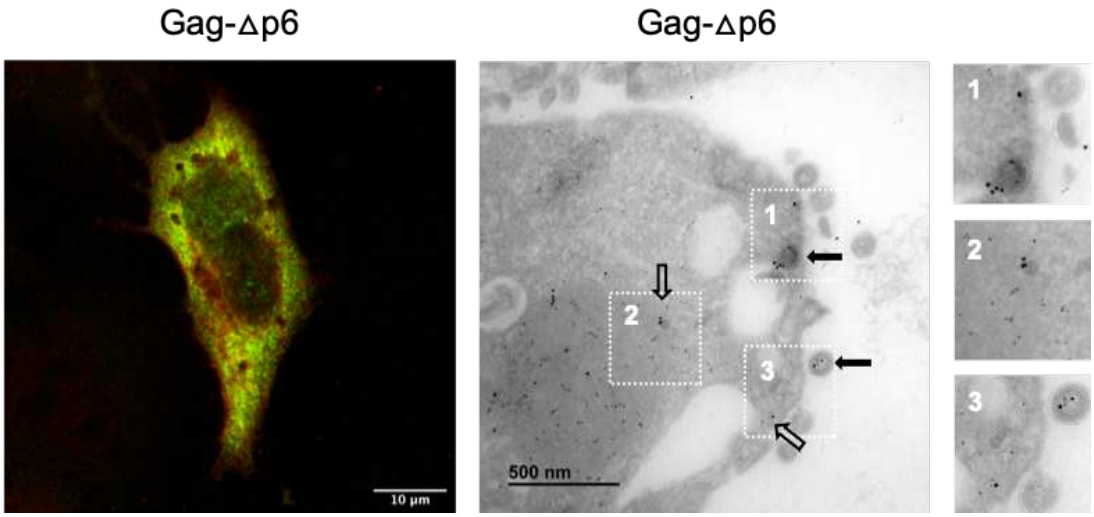


Figure 46 : Visualisation de la colocalisation entre Gag-Δp6 et ARNg par microscopie confocale et des clusters formés par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec un plasmide modifié pNL4.3-MS2-Δenv exprimant Gag-Δp6 et l'ARNg et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

10. Étude de l'implication du 5'UTR de l'ARNg dans la formation des clusters Gag-ARNg

L'assemblage viral, via l'encapsidation de l'ARNg, nécessite des interactions spécifiques entre Gag et la région Psi localisée dans le 5' UTR de l'ARNg et qui comprend les tiges-boucles SL1, SL2, SL3 et SL4 (Kuzembayeva et al., 2014; Rein, 2019). SL1 contient la séquence d'initiation de la dimérisation de l'ARNg (Clever et al., 1995; Ferrer et al., 2016; Keane et al., 2015; Paillart et al., 1996; Skripkin et al., 1994). Des études *in vitro* ont montré que la tige-boucle SL1 était également le site primaire de liaison de Gag (Abd El-Wahab et al., 2014), ce qui nous a amené à évaluer le rôle de SL1 dans la formation des clusters Gag-ARNg dans le cadre de la technique de MET que nous avons utilisé. Tout d'abord, la délétion du domaine SL1 (Figure 40) n'a pas d'impact sur la quantité de Gag présente dans les lysats et surnageants cellulaires (Figure 41, gels de gauche). De plus, la délétion de SL1 n'a aucun impact sur l'export nucléaire de l'ARNg, comme illustré par la quantité importante d'ARNg détecté dans le cytoplasme par microscopie confocale. Une forte colocalisation de Gag et de l'ARNg-ΔSL1 est observée dans les cellules (Figure 47 A, image de gauche). Le coefficient de corrélation r pour ce mutant est de 0,57 +/- 0,03, statistiquement très proche de l'ARNg-WT.

L'analyse par MET a confirmé la présence de clusters Gag-ARNg-ΔSL1 dans le cytoplasme, à côté de la MP (Figure 47 A, image de droite, inserts 1 à 3). Des clusters sont également retrouvés dans les virus (Figure 47 A, image de droite, inserts 1 et 2). L'analyse du ratio de virus vides sur pleins démontre qu'environ un tiers des particules virales contiennent de l'ARNg-ΔSL1 (Table 6). La distance moyenne

entre Gag et l'ARNg-ΔSL1 est de 61,8 nm, ce qui est similaire à la valeur obtenue avec l'ARNg-WT comme le confirme la magnitude N (Table 5).

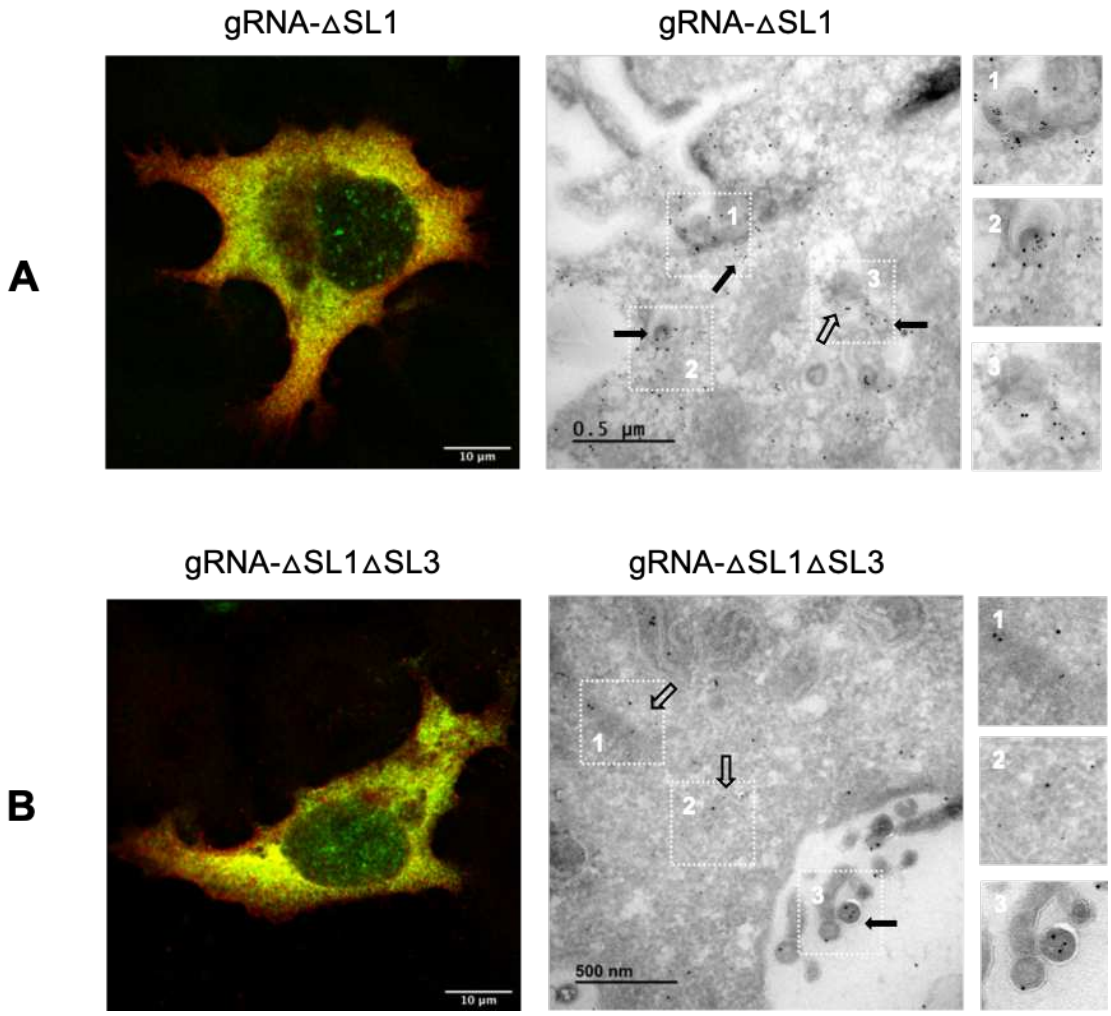


Figure 47 : Impact des mutations de la région 5'UTR de l'ARNg sur la colocalisation entre Gag et l'ARNg par microscopie confocale et la formation de clusters par MET.

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les plasmides modifiés pNL4.3-MS2-Δenv codant pour l'ARNg-ΔSL1 (A), ou l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 (B) et un plasmide exprimant la protéine MCP-eGFP-NLS (Ratio 0,6/0,4). Les cellules ont été préparées pour la microscopie confocale et pour la MET comme décrit dans la figure 35 et observées à 24 h PT. Chaque panel représente les phénotypes majeurs observés.

Pour continuer, la tige-boucle SL3 a été délétée en plus de SL1 (Figure 40). En effet, SL3 interagit fortement avec la NC et contient des séquences nucléotidiques nécessaires à une encapsidation spécifique du génome (De Guzman, 1998; Lever et al., 1989). L'analyse Western Blot révèle que l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 produit une quantité de Gag similaire à l'ARNg-WT dans les lysats et surnageants cellulaires (Figure 41, gels de gauche). En microscopie confocale, Gag et l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 sont diffus dans le cytoplasme et à la périphérie cellulaire (Figure 47 B, image de gauche). Une

colocalisation est présente entre Gag et l'ARNg-ΔSL1ΔSL3, comme l'illustre le coefficient de corrélation r qui est de 0,64 +/- 0,07, ce qui est statistiquement identique à l'ARNg-WT. (Table 4). Cette colocalisation entre Gag et l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 est étonnante étant donné que la tige boucle SL3 est largement décrite dans la littérature comme étant impliquée dans l'encapsidation de l'ARNg. Selon toute logique, sa délétion aurait dû diminuer la colocalisation entre Gag et l'ARNg. Ce résultat de microscopie confocale est d'autant plus inattendu que la distance entre Gag et l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 est similaire au WT. Les clusters Gag-ARNg sont présents dans le cytoplasme en MET (Figure 47 B, image de droite, inserts 1 et 2) et dans les particules virales (Figure 47 B, image de droite, insert 3), La distance moyenne entre Gag et l'ARNg-ΔSL1ΔSL3 est de 112,7 nm, statistiquement plus importante que pour l'ARNg-WT (Table 5), ce qui souligne une absence de formation de complexes. Un nombre conséquent de particules virales est présent dans le milieu extracellulaire, en accord avec les analyses de Western Blot et 16% des virions contiennent de l'ARNg (Table 6), ce qui est plus faible que pour l'ARNg-WT et que pour l'ARNg-ΔSL1.

Ce mutant ARNg-ΔSL1ΔSL3 est le seul parmi les douze mutants effectués qui présente des résultats contradictoires entre le calcul du coefficient r et le calcul des distances. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces différences. Tout d'abord la distribution des distances en MET varie selon les mutants analysés. C'est notamment le cas pour l'ARNg-ΔSL1ΔSL3, qui possède un très grand écart-type de 39 nm. Les distances pour ce mutant peuvent donc aller jusqu'à un maximum de de 159 nm, ce qui se rapproche de la résolution du microscope confocal (250 nm). Il est donc plausible d'imaginer que le microscope confocal puisse observer des différences avec de telles grandes distances, se traduisant par une colocalisation entre Gag et l'ARNg, alors qu'en MET les deux partenaires ne forment pas de clusters. Une autre hypothèse serait une interaction différente des protéines MCP-eGFP-NLS sur l'ARN sauvage et sur l'ARNg-ΔSL1ΔSL3. En effet, entre 1 et 48 protéines MCP peuvent se lier sur les tiges-boucles MS2 présentes dans l'ARNg. Cependant, la délétion de SL1 et SL3 peut éventuellement remodeler la structure tridimensionnelle de l'ARNg, et en favorisant ou défavorisant le nombre de protéine GFP/ARN. Le calcul de Pearson étant sensible au rapport vers sur rouge, cela peut impacter le coefficient de Pearson mais sans pour autant modifier le calcul de distance observée par MET. De plus, un biais dans l'utilisation de ces deux techniques est la visualisation directe de la GFP par confocal et par des anticorps en MET. Ainsi, les deux techniques de microscopie utilisées dans cette étude (confocal et MET) fournissent globalement la même tendance dans les résultats obtenus mais ne sont pas totalement comparables, avec quelques variations qui pourraient être dues au nombre d'échantillons analysés, à la résolution du microscope utilisé ou encore à la liaison des protéines MS2 sur les différents mutants.

Partie 2 : Utilisation des connaissances développées en microscopie dans d'autres problématiques scientifiques du laboratoire

Les connaissances techniques en microscopie confocale et électronique à transmission que j'ai développées durant ma thèse m'ont permis de contribuer à deux publications scientifiques sur la morphogenèse du Virus de l'Hépatite B (VHB) et sur le VIH-1.

L'article présenté en Annexe 2 de ce manuscrit traite des domaines de la protéine core du VHB essentiels pour l'assemblage de la capside virale dans un contexte cellulaire. La protéine core (HBc) d'HBV contient un domaine N-terminal essentiel pour la formation de la capside virale et un domaine C-terminal basique et phosphorylé impliqué dans la réplication de l'ADN viral. Dans cette étude, l'assemblage de la capside du VHB a été investigué dans des cellules Huh7 par des techniques de microscopie optique quantitatives (FLIM, FRET, FCS) et par MET. Par microscopie optique, nous montrons qu'HBc s'oligomérise rapidement après la transfection et à des concentrations sub-micromolaires. Ces oligomères diffusent de façon homogène au travers de la cellule et contiennent entre 170 et 230 protéines HBc en accord avec le nombre de protéines HBc dans une capside virale. Dans le cadre de ces recherches, j'ai participé aux expérimentations de MET par la technique Tokuyasu afin de mettre en évidence et de localiser dans les cellules la protéine HBc par un marquage avec des nanoparticules d'or. Grâce à la MET, nous avons pu montrer que ces oligomères contenant une protéine fluorescente eGFP forment des capsides virales dont la morphologie est très proche des particules virales natives. Inversement, aucun assemblage n'est observé avec les deux types de microscopies quand le domaine N-terminal d'HBc est exprimé seul. Ce résultat est très différent des résultats obtenus *in vitro* et souligne l'importance de la liaison CTD-acide nucléique pour une oligomérisation d'HBc en milieu cellulaire. Par ailleurs, la formation d'oligomères d'HBc a aussi été observée par FCS et FLIM après la délétion de l'hélice $\alpha 3$ mais seule la MET a permis de montrer que les oligomères ne formaient pas de particules virales.

L'article présenté en Annexe 3 de ce manuscrit traite de l'implication des kinases de la famille des phosphatidylinositol 4,5 phosphate de type 1 (PIP5K1) dans le ciblage de la protéine Gag du VIH-1 à la membrane plasmique lors de l'assemblage viral. La voie de synthèse majeure du PI(4,5)P2, lipide présent dans la MP et impliqué dans l'ancrage de Gag dans la membrane lors de l'assemblage, implique les kinases PIP5K1. Dans cette étude réalisée dans des cellules TZM-BL, le comportement de Gag dans le contexte d'une inhibition de ces kinases par des siRNA a été évalué. Il a ainsi été démontré que les isoformes α et γ des PIP5K1 jouent un rôle clé dans le ciblage de Gag à la MP. Leur

dérégulation entraine une relocalisation de la protéine Gag dans des compartiments intracellulaires de type endosomes tardifs ou lysosomes. Dans le contexte de cette étude, j'ai réalisé les expériences de transfections de Gag dans les cellules TZM-BL préalablement traitées avec les siRNA dirigés contre les différents PIP5K1. J'ai également effectué la détection par immunofluorescence de Gag et de la MP grâce le marqueur dsQ12S puis évalué leur colocalisation grâce au coefficient de corrélation r de Pearson. Cette étude a permis d'apporter des précisions non négligeables sur le mécanisme d'assemblage de la protéine Gag à la membrane plasmique et l'implication des kinases modulant les lipides membranaires dans ce processus.

Partie 3 : Étude de l'expression de Gag et de l'ARNg par microscopie corrélative

La première partie de ce travail de thèse nous a permis de localiser avec précision les clusters composés de Gag et de l'ARNg du VIH-1. Au vu de l'expérience et de l'expertise développée en MET tout au long de ma thèse et de la connaissance du phénotype d'expression de Gag et de l'ARNg dans les cellules HeLa, j'ai souhaité tester une seconde technique, la microscopie corrélative qui combine la microscopie confocale et la microscopie à fluorescence (CLEM). L'objectif de cette technique est de visualiser un phénotype et/ou une zone d'intérêt dans une cellule cible et d'associer les partenaires viraux détectés à l'ultrastructure et l'environnement cellulaire. Dans le cadre de ces travaux, il serait ainsi possible de détecter une colocalisation de Gag et de l'ARNg en microscopie confocale et de l'associer avec l'ultrastructure cellulaire et virale apportée par la MET.

1. Détection de la protéine Gag-miniSOG par CLEM

La première étape de ce travail fut de mettre au point la technique CLEM. Les expérimentations ont été initiées uniquement sur la protéine Gag, qui est facilement détectable car elle s'assemble sous la forme de « Virus-Like Particles » (VLP). Afin de suivre Gag en microscopie corrélative, nous avons utilisé la protéine miniSOG clonée dans un plasmide codant pour la protéine Gag (Gag-miniSOG). miniSOG est insérée entre les domaines MA et CA car la co-expression de protéine Gag ainsi décorée et de Gag native a peu d'impact sur l'assemblage et conduit à la production de particules virales infectieuses dont la capside s'assemble correctement (Derdowski et al., 2004; Müller et al., 2004). Ce plasmide exprime la protéine Gag seule sous le contrôle d'un promoteur fort CMV, à l'inverse du Gag utilisé dans la partie 1, qui est exprimé par un promoteur viral de type LTR. La protéine miniSOG est flavoprotéine de 106 aa qui fut identifiée 2011 et qui est 2,5 fois plus petite que l'eGFP (Shu et al., 2011). Cette protéine est utilisable en microscopie corrélative car elle peut être détectée en microscopie confocale et en MET. Elle fluoresce entre 500 et 528 nm quand elle est excitée par une longueur d'onde

de 448 nm. De plus, l'illumination de la protéine miniSOG génère des singulets d'oxygène qui sont suffisants pour catalyser localement la polymérisation de la diaminobenzidine en un produit de réaction osmiophile observable en MET (Souslova et al., 2017).

Des cellules HeLa ont été cultivées dans des boites IBIDI à fond quadrillé puis transfectées par un mélange de plasmides Gag et Gag-miniSOG (ratio 0,7/0,3). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont fixées chimiquement en PFA et observées par microscopie confocale. La cellule avec un phénotype d'intérêt est visualisée, imagée, et repérée grâce au quadrillage. Cette cellule est traitée avec de la diaminobenzidine (DAB) jusqu'à l'apparition de polymère osmiophiles de couleur marron dans la cellule, signe de la polymérisation de la DAB et de la photo-oxydation de la protéine miniSOG. Les cellules sont ensuite traitées pour permettre leur observation en MET. Chaque cellule d'intérêt identifiée par microscopie confocale et incluse dans une résine hydrophobe est isolée par découpe avec une scie à métaux. Des coupes ultrafines de cellules de 90 nm d'épaisseur sont réalisées avec un ultramicrotome puis déposées sur des grilles de microscopie électronique en nickel à un trou puis sont observées à l'aide d'un MET.

Un exemple pertinent de l'utilisation de cette technique pour notre problématique est présenté en figure 48. Deux cellules sont présentes dans le champ du microscope confocal, où l'on distingue clairement une accumulation de la protéine Gag-miniSOG au niveau de la MP, phénotype qui est retrouvé dans 80% des observations (Figure 48 A). Il est à noter que le phénotype de la protéine Gag est différent entre ces images et les images décrites dans la partie 1, où Gag était diffuse dans le cytoplasme avec une accumulation à la MP. Cela peut s'expliquer par le fait que le gène *gag* de ce plasmide est sous le contrôle du promoteur fort CMV alors que dans le chapitre précédent le gène *gag* du plasmide pNL4.3 était sous le contrôle du LTR viral. Ces deux cellules sont ensuite retrouvées en MET sous un angle différent, et on peut distinguer qu'elles sont entourées de deux autres cellules, invisibles en microscopie confocale (Figure 48 B). Les images de microscopie confocale et de MET ayant des plans axiaux similaires ont été choisis afin de retrouver cellules dans des conditions d'observation proches. Lorsque le champ de la MET est agrandi (voir insert figure 48 B), on peut facilement distinguer des sphères plus ou moins denses aux électrons présentes dans le milieu extracellulaire tout autour de la MP des deux cellules. Ces sphères sont des particules virales formées par l'assemblage des petits oligomères de Gag-miniSOG. La microscopie corrélative permet donc dans le cas présent de démontrer que l'accumulation de signaux fluorescents verts à la MP en microscopie confocale est le fruit d'une accumulation de particules virales formées de Gag-miniSOG dans le milieu extracellulaire en MET. Les expériences de CLEM nous ont permis relier le phénotype observé pour une cellule imagée en microcopie confocale à des images de cette même cellule prises à l'aide d'un MET, qui apporte des informations relatives à l'ultrastructure cellulaire et virale de par sa meilleure résolution.

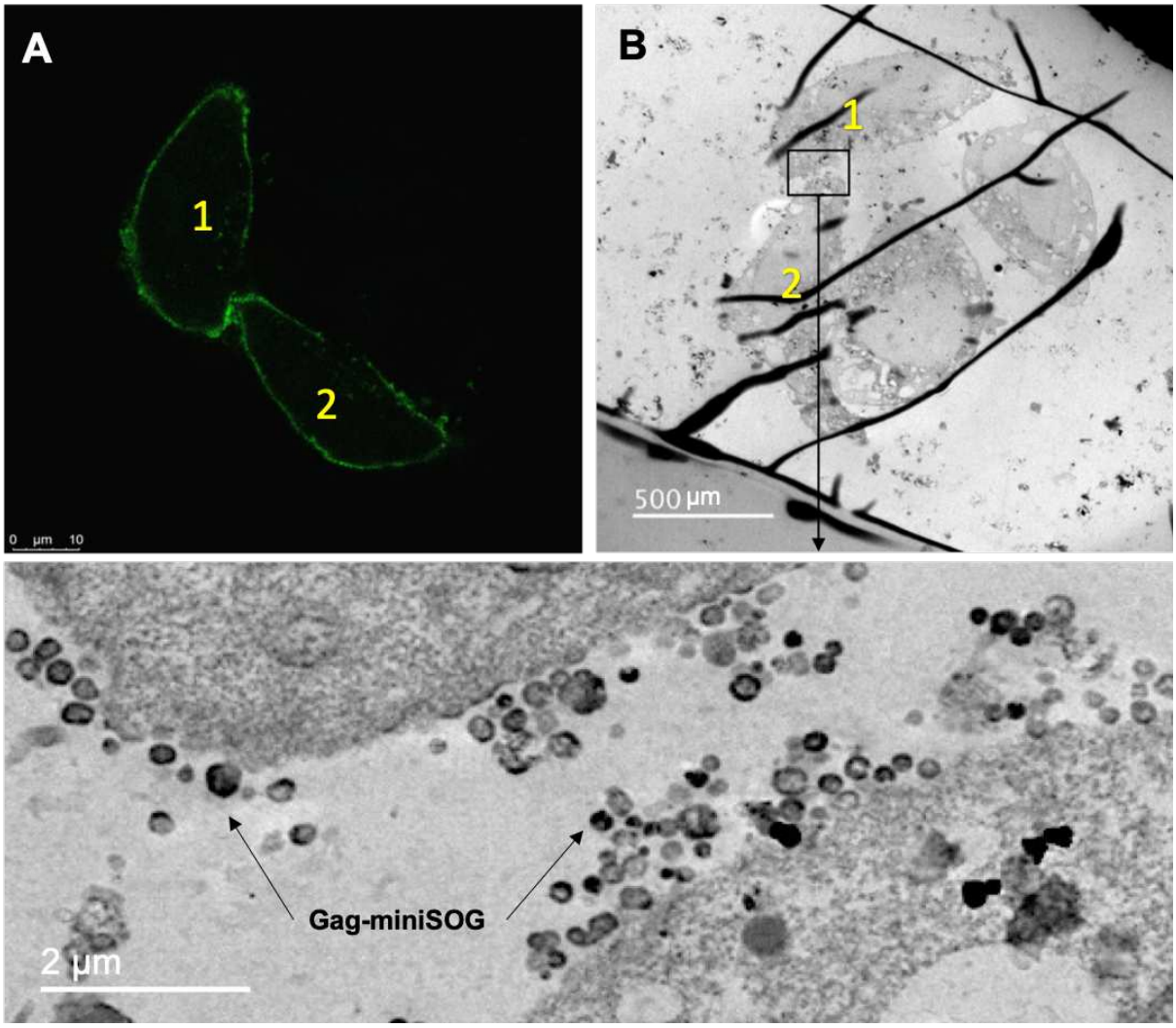


Figure 48 : Accumulation de particules virales du VIH-1 formées de la protéine Gag-miniSOG dans le milieu extracellulaire.
Représentation de deux cellules HeLa transfectées avec un mélange de plasmides Gag et Gag-miniSOG (Ratio 0,7/0,3) puis observées en microscopie confocale (A) et en MET (B). La fluorescence verte est représentative de l'expression de la protéine Gag-miniSOG présente au niveau de la MP de la cellule. Gag-miniSOG est retrouvé sur les images de microscopie électronique sous forme de particules virales sphériques denses aux électrons.

Un autre phénotype d'expression de la protéine Gag-miniSOG, identifié dans environ 20% des observations, correspond à une accumulation de signaux fluorescents verts à la MP ainsi que sous forme de spots dans le cytoplasme cellulaire (Figure 49 A). Lorsque ces cellules sont observées en MET, nous distinguons nettement que ces spots correspondent à des particules virales accumulées dans des vésicules cellulaires endosomales qui ressemblent à des corps multivésiculaires, les MVB (Multi Vesicular Bodies) (Figure 49 B). Ce phénotype beaucoup plus rare est néanmoins très intéressant car il pourrait éventuellement signifier que les particules virales migrent jusqu'à la MP

dans ce type de vésicules endoplasmique (Grigorov et al., 2007, 2006). Ce phénotype a très peu été observé dans les expériences présentées dans la partie 1 (non-montré), ce qui peut s'expliquer potentiellement par la différence de niveau d'expression de Gag ici sous contrôle du promoteur CMV.

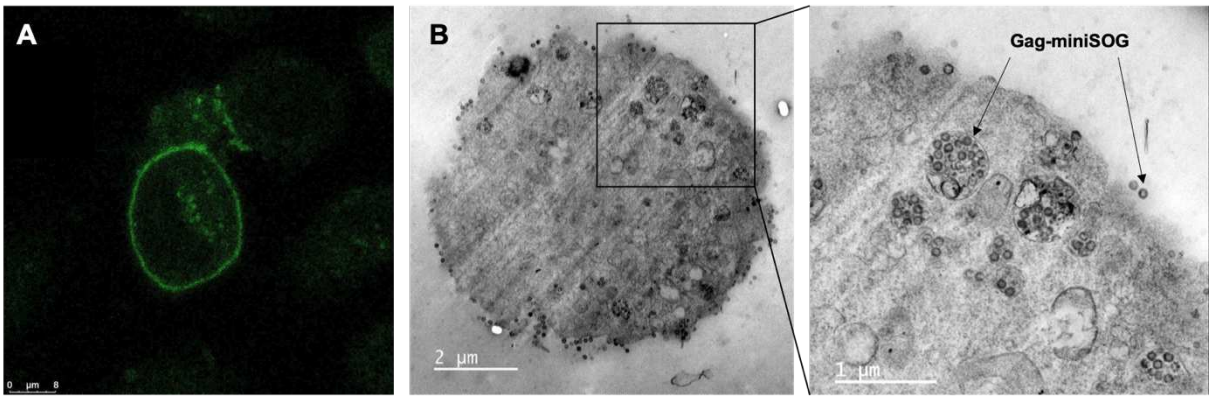


Figure 49 : Accumulation de particules virales du VIH-1 formées de la protéine Gag-miniSOG dans des vésicules endosomales.
Représentation d'une cellule HeLa transfectées avec un mélange de plasmides Gag et Gag-miniSOG (Ratio 7/3) puis observées en microscopie confocale (A) et en MET (B). La fluorescence verte est représentative de l'expression de la protéine Gag-miniSOG présente dans des spots cytoplasmiques. Gag-miniSOG est retrouvé sur les images de microscopie électronique sous forme de particules virales sphériques denses aux électrons dans des corps endosomaux.

2. Détection de la protéine Gag-miniSOG dans un contexte de génome complet par CLEM

Des expérimentations similaires de détection de la protéine Gag ont été menées en présence du génome complet du VIH-1, l'ARNg n'est ici pas détecté. Les cellules HeLa transfectées par un mélange du plasmide pNL4.3 et du plasmide Gag-miniSOG (Ratio 0,7/0,3) ont été traitées comme précédemment décrit. Un phénotype similaire est observé pour la protéine Gag, avec une localisation cytoplasmique et une accumulation à la MP en microscopie confocale (Figure 50 A). Par MET, cela se traduit par la présence de particules virales à la MP en cours de bourgeonnement (Figure 50 B, insert 1, flèche pleine), ayant bourgeonné et immatures (Figure 50 B, insert 2, flèche vide), en cours de maturation (Figure 50 B, insert 2, flèche pleine) et complètement matures (Figure 50 B, insert 2, flèche pleine).

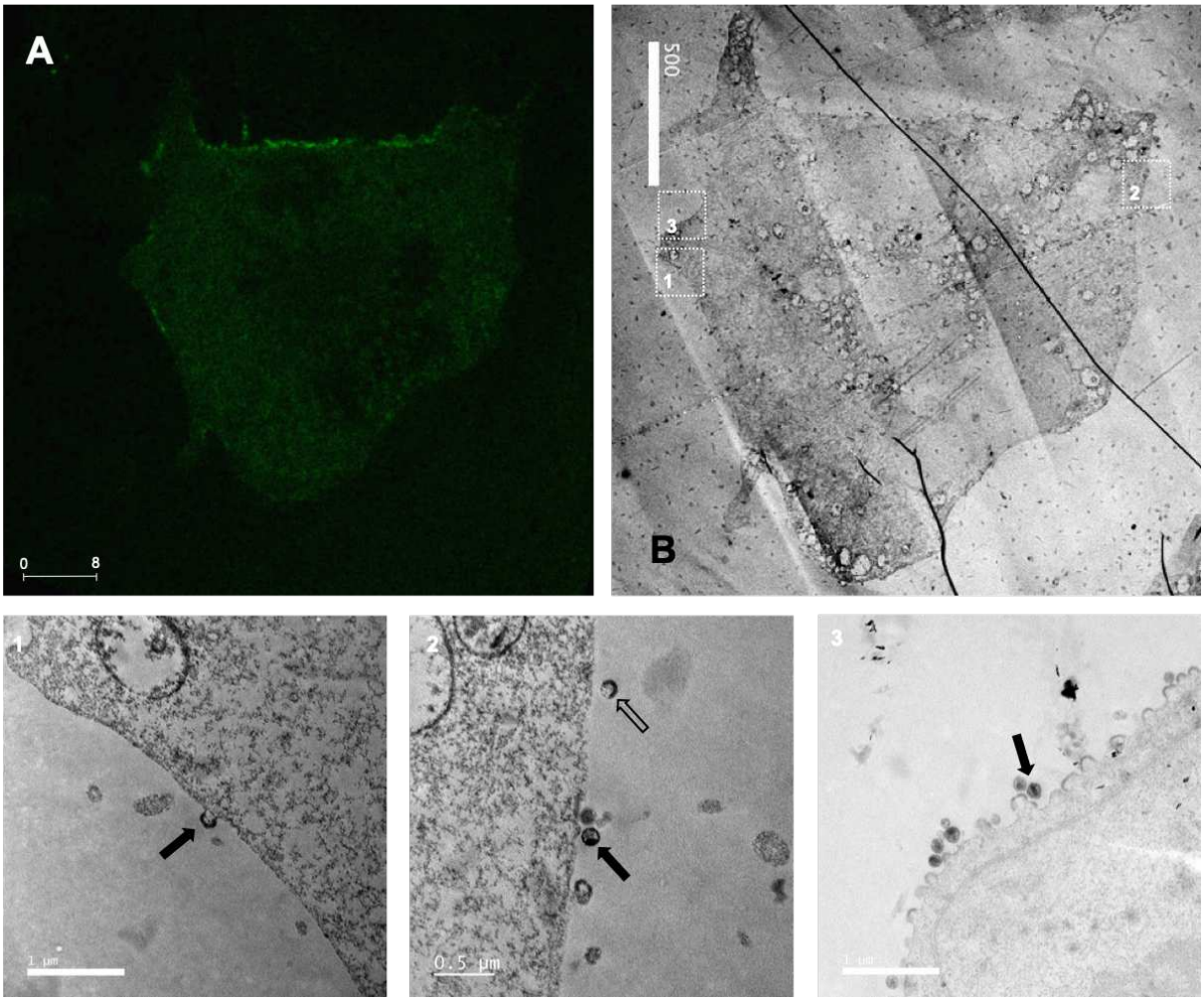


Figure 50 : Expression des protéines Gag et Gag-miniSOG dans le cadre de l'expression du génome complet du VIH-1 en cellules HeLa.
Représentation d'une cellule HeLa transfectée avec un mélange de plasmides pNL4.3 exprimant la protéine Gag sauvage et Gag-miniSOG puis observées en microscopie confocale (A) et en MET (B). La fluorescence verte est représentative de l'expression de la protéine Gag-miniSOG présente dans le cytoplasme et à la MP. Gag-miniSOG est retrouvé sur les images de MET sous forme de particules virales sphériques plus ou moins maturées.

L'objectif a ensuite été d'appliquer cette technique de CLEM à la détection d'un phénotype de colocalisation entre Gag et l'ARNg du VIH-1 associé à la résolution de le MET et l'ultrastructure cellulaire qu'elle apporte. Cependant, deux points négatifs se sont présentés à nous. Le premier point faible est que la protéine Gag-miniSOG semble indétectable par MET quand elle est présente sous forme de petits oligomères dans le cytoplasme cellulaire tandis qu'elle est très bien détectée dans le cas de particules virales assemblées résultant d'une polymérisation de cette protéine. Cela peut s'expliquer par la petite taille des oligomères de Gag ou par le signal insuffisant de la miniSOG photo-oxydée sur ces oligomères. De plus, miniSOG possède un rendement quantique très faible de 0,03 (en comparaison le rendement quantique de la GFP est de 0,6) et est très photosensible. Le second

problème soulevé est la nécessité de détecter l'ARNg en plus de la protéine Gag-miniSOG. La protéine MCP-eGFP-NLS utilisée pour détecter l'ARNg dans la première partie ne peut être visualisée directement par MET comme c'est le cas pour la protéine Gag-miniSOG, étant donné que l'eGFP ne possède pas la capacité de former des structures denses aux électrons. La solution envisageable pour pallier à ces deux problèmes serait de réaliser un immunomarquage de l'ARNg avec des nanoparticules d'or comme cela est décrit dans la partie 1 des résultats de ce manuscrit. Or, la réalisation d'immunomarquages avec des anticorps s'avère ardue avec le type de microscopie électronique employé ici, notamment à cause de la résine épon utilisée. Cette résine est hydrophobe, nécessite des déshydratations et l'emploi de produits chimiques qui altèrent les anticorps, les rendant inutilisables dans ce type de technique. Il a donc fallu trouver un moyen de combiner la détection de Gag et de l'ARNg en CLEM en associant deux immunomarquages dirigés contre Gag et l'ARNg via la MCP-eGFP-NLS, comme dans la partie 1.

3. Marquage de la protéine Gag sur une résine hydrophile

Pour outrepasser les problèmes de détection de l'ARNg et des oligomères de Gag en CLEM, notre choix c'est porté sur l'utilisation de résines hydrophiles qui permettent un immunomarquage avec des nanoparticules d'or, à l'inverse des résines hydrophobes mentionnées dans le paragraphe précédent. Dans un premier temps, des cellules HeLa exprimant uniquement la protéine Gag ont été testées. Les cellules ont été congelées à haute pression afin de préserver les structures de façon non-chimique. L'eau des cellules a été substituée à froid par l'acétone puis les cellules ont été incluses dans une résine hydrophile K4M de type méthylmétacrylate. Des marquages avec un anticorps anti-Gag p24 et un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 6 nm ont été réalisées sur des coupes de cellules HeLa. Des résultats probants ont été obtenus avec ce type de résine, où l'on a pu détecter des cellules présentant de nombreuses particules virales immatures ayant bourgeonnées (Figure 51 A). Ces virus sont marqués avec de nombreuses nanoparticules d'or de 6 nm, ce qui valide la possibilité de marquage de Gag sur cette résine hydrophile. L'avantage de cette approche est la détection facilitée de la protéine Gag intracellulaire, comme illustré par le marquage de structures plus denses aux électrons par des billes d'or de 6 nm dans le cytoplasme cellulaire (Figure 51 B et C). Cette résine est donc utilisable dans notre approche de CLEM dans l'optique de détecter Gag et l'ARNg via un anticorps anti-eGFP dirigé contre la protéine MCP-eGFP-NLS, comme utilisé dans la partie 1.

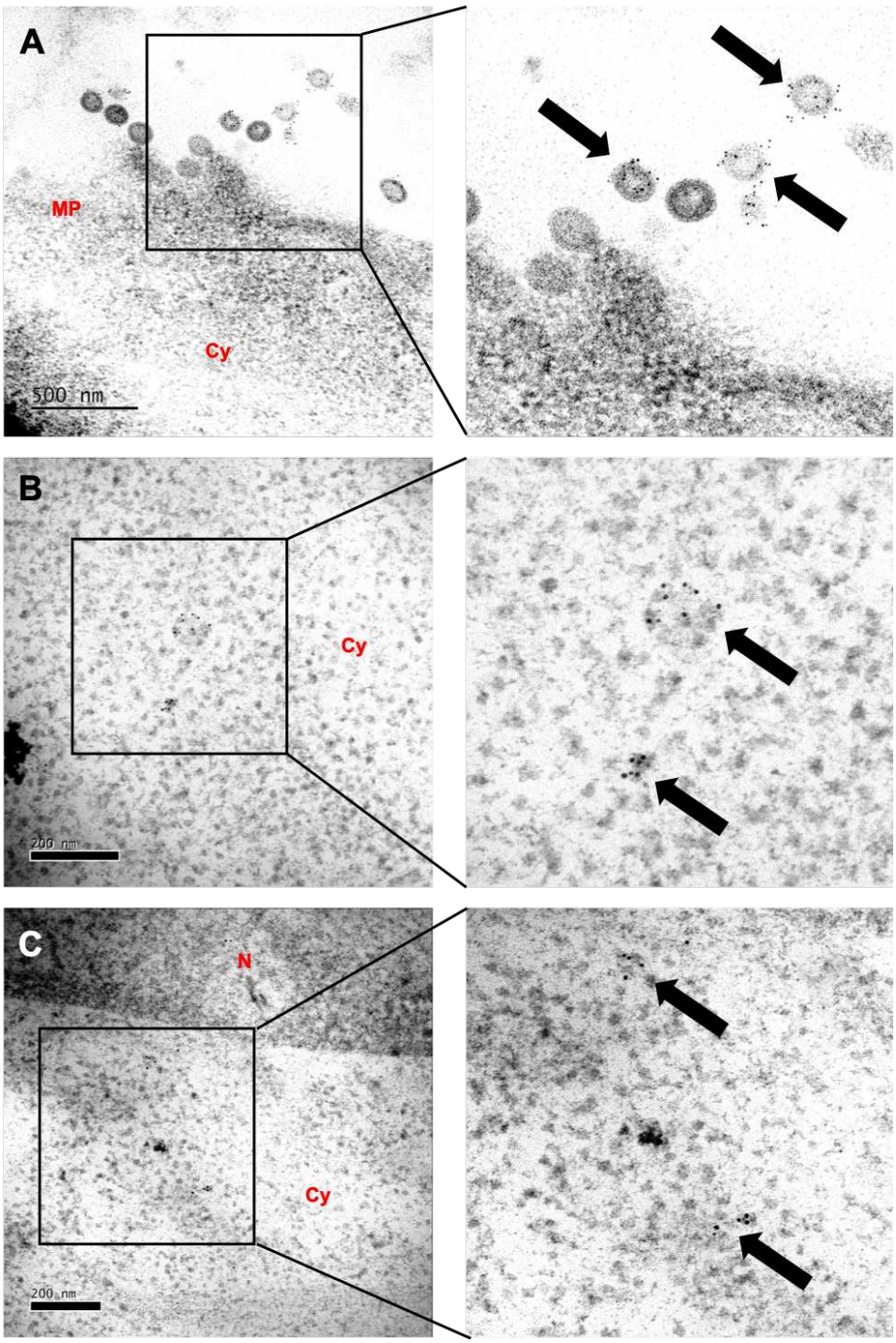


Figure 51 : Expression et marquage de la protéine Gag dans des cellules HeLa incluses en résine K4M. Les cellules HeLa exprimant la protéine Gag et cultivées sur des disques sapphires ont été fixées par haute pression et traitées par substitution à froid avant d'être incluses en résine K4M. Des coupes cellulaires ont été réalisées puis un marquage de Gag a été effectué avec un anti-Gag p24 détecté par des nanoparticules d'or de 6 nm. (A) Gag est détecté sous forme de particules virales ayant bourgeonné ou en cours de bourgeonnement. (B) et (C) : Gag est détecté sous forme de clusters de nanoparticules d'or présents dans le cytoplasme cellulaire.

4. Détection de la protéine Gag et de l'ARNg par CLEM

L'étape ultime de ce travail fut de réaliser des expérimentations de type CLEM sur des cellules HeLa exprimant l'ARNg détecté par la protéine MCP-eGFP-NLS et la protéine Gag. Ici, la protéine Gag est

fusionnée à la protéine reportrice mCherry, qui fluoresce en rouge et ne sera donc pas confondue avec l'eGFP. Les cellules exprimant Gag-mCherry et l'ARNg ont ainsi été détectées grâce au quadrillage présent sur les disques sapphires de culture cellulaire (Figure 52 A, B et C).

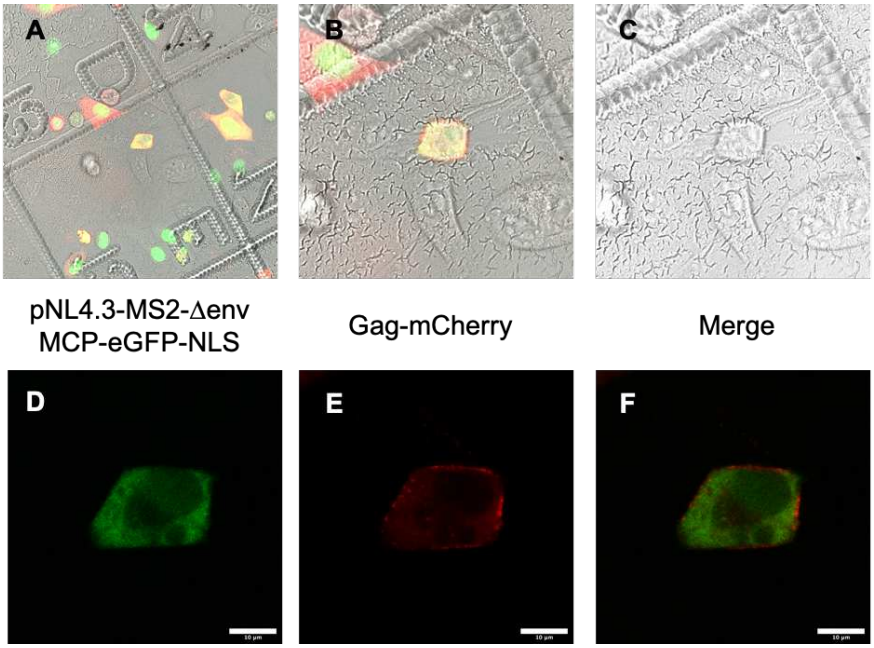


Figure 52 : Expression de l'ARNg du VIH-1 et de la protéine Gag-mCherry dans des cellules HeLa.
La cellule HeLa détectée grâce au quadrillage présent sur le support de culture cellulaire en fluorescence et lumière blanche (A et B), en lumière blanche (C). Cette cellule exprime l'ARNg-MS2 (D) ainsi que la protéine Gag-mCherry (E), qui sont colocalisées au niveau de la membrane plasmique (F).

La cellule d'intérêt fluorescente est détectée (Figure 52 B) et la lumière blanche permet de détecter la forme de la cellule par rapport au quadrillage (Figure 52 C). Le phénotype d'intérêt est une expression cytoplasmique de l'ARNg (Figure 52 D) et une expression cytoplasmique et à la MP de la protéine Gag-mCherry (Figure 52 E), se traduisant par une colocalisation potentielle des deux partenaires à la MP (Figure 52 F). L'étape suivante est de retrouver cette même cellule en MET. Malheureusement, plusieurs problèmes techniques ont été rencontrés jusqu'à présent, m'empêchant de corréler les images de microscopie confocale à celles de MET. Parmi ces problèmes, il y a notamment la dissociation difficile du disque sapphire de la résine, réduisant considérablement le nombre d'échantillons exploitables et également la réalisation ardue de coupes cellulaires par ultramicrotomie à partir d'une monocouche de cellules, comme c'est le cas ici étant donné que les cellules sont cultivées sur une lamelle de verre et non-culottées comme c'est le cas dans la partie 1. Une fois ces deux points négatifs résolus, la cellule possédant une colocalisation de Gag et de l'ARNg en microscopie confocale pourra être retrouvée à plus haute résolution par MET, qui nous donnera les informations concernant l'ultrastructure entourant ce phénotype grâce à un marquage de Gag et de l'ARNg avec des nanoparticules d'or de tailles différentes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'assemblage du VIH-1 fait intervenir les protéines structurales Gag qui sélectionnent spécifiquement l'ARN génomique viral sous forme dimérique pour l'encapsider dans une particule virale (Sundquist and Krausslich, 2012). De nombreuses études réalisées sur des lignées cellulaires ou des cellules lymphocytaires ont démontré que des complexes nucléoprotéiques se forment entre la protéine Gag et l'ARNg dans le cytoplasme (Boutant et al., 2020; Ferrer et al., 2016; Hendrix et al., 2015; Kemler et al., 2010; Kutluay and Bieniasz, 2010; Moore et al., 2007; Poole et al., 2005), au niveau de la membrane plasmique (Chen et al., 2016; Ferrer et al., 2016; Jouvenet et al., 2009; Sardo et al., 2015) et plus rarement dans le noyau des cellules infectées (Stake et al., 2013; Tuffy et al., 2020). L'essentiel de ces résultats publiés ont été obtenus par des méthodes d'imagerie optique limitées par leur résolution empêchant ainsi l'observation de complexes nucléoprotéiques de petite taille ou d'oligomères formés initialement lors de l'assemblage viral. L'objectif de cette étude était d'évaluer la localisation cellulaire de Gag et de l'ARNg du VIH-1 dans des cellules HeLa et de suivre temporellement la formation de complexes nucléoprotéiques formés de ces deux partenaires viraux lors de l'initiation de l'assemblage du VIH-1 grâce à une technique hautement résolutive. L'emploi de la microscopie électronique à transmission permet ainsi d'obtenir des détails sur l'ultrastructure cellulaire entourant la formation de ces complexes. De plus, la microscopie électronique est la seule technique permettant d'observer des virus.

Avec notre approche de MET, nous avons majoritairement observé de nombreux regroupements de Gag et d'ARNg (clusters) grâce aux nanoparticules d'or dans le cytoplasme, à la membrane plasmique et dans les particules virales. De manière intéressante, il semble que la localisation de ces clusters évolue en fonction du temps. En effet, à 12 h PT, Gag et l'ARNg forment des clusters dans le cytoplasme et sont souvent très proches de l'enveloppe nucléaire, ce qui suggère que Gag sélectionne l'ARNg le plus probablement directement après sa synthèse et son export nucléaire de l'ARNg. À 24 h et 48 h PT, nous avons observé une augmentation du nombre de clusters Gag-ARNg à côté de la MP ainsi que dans des particules virales, illustrant une évolution temporelle de la localisation des clusters. Néanmoins, il n'est pas possible d'exclure complètement que des complexes se forment entre Gag et ARNg directement à la MP, comme cela a été observé par TIRF (Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009), mais cette localisation des clusters est clairement très peu observée à 12 h PT. Notre étude est ainsi en accord avec les observations d'autres équipes ayant décrit la présence des complexes Gag-ARNg dans le cytoplasme (Boutant et al., 2020; Ferrer et al., 2016; Hendrix et al., 2015; Kutluay and Bieniasz, 2010) et à la MP (Chen et al., 2014; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2009). Le groupe de Lever a observé une colocalisation de Gag avec l'ARNg dans la région périnucléolaire et a proposé qu'une formation des complexes nucléoprotéiques au niveau des centrosomes pourraient faciliter l'encapsidation de l'ARNg par Gag (Poole et al., 2005). Le pore nucléaire et l'architecture du centriole

ont été étudiés par microscopie électronique (LeGuennec et al., 2021; von Appen and Beck, 2016) mais nous n'avons pas observé de clusters Gag-ARNg dans les environs de ces deux structures cellulaires lors de nos expérimentations. La localisation des complexes Gag-ARNg à côté des centrioles pourrait être un événement rare et de ce fait difficile à observer par MET.

De façon intéressante, quelques regroupements de particules virales ont été détectés dans des vésicules présentes dans le cytoplasme les cellules HeLa. Ces vésicules semblent être des corps multivésiculaires (MVB), puisqu'ils sont positifs au marqueur Lamp1. Ces virus contiennent majoritairement de la protéine Gag et plus rarement de l'ARNg, à l'inverse des virus retrouvés dans le milieu extracellulaire (résultats non-montrés). Plusieurs équipes ont également observé cette accumulation subcellulaire de particules du VIH-1 dans des MVB dans des cellules lymphocytaires Jurkat et dans des lignées cellulaires (HeLa, HEK293T…) (Grigorov et al., 2006; Joshi et al., 2009; Nydegger et al., 2003; Sherer et al., 2003), malgré le fait que le VIH-1 s'assemble majoritairement au niveau de la MP dans ces cellules (Finzi et al., 2007; Jouvenet et al., 2006; Ono et al., 2004). Cette accumulation anecdotique de virus dans les MVB a-t-elle un rôle particulier dans l'assemblage viral ou est-elle uniquement une voie de stockage pour les particules virales non-infectieuses, puisque les MVB fusionnent avec les lysosomes pour dégrader leur contenu ? Il pourrait être intéressant de purifier ces MVB des cellules transfectées (de Araújo et al., 2015; Singer-Krüger et al., 1993) et d'évaluer leur contenu en ARN viraux et cellulaires par RT-qPCR afin de confirmer qu'il s'agit bien de particules virales « vides ». Le travail réalisé dans cette étude sur les cellules HeLa est un bon modèle d'étude du traffic et de l'assemblage du VIH-1 par rapport aux lignées lymphocytaires (Jurkat, MT4R5, MOLT…). Il serait désormais intéressant d'étudier la localisation des oligomères de Gag seuls ou sous forme de complexes avec l'ARNg dans un autre modèle où l'assemblage semble différent, les macrophages. En effet, à l'inverse des lymphocytes, les macrophages présentent une localisation différente de Gag dans les cellules infectées, allant d'une expression diffuse dans le cytoplasme à une accumulation sous forme de spots à la périphérie cellulaire ainsi que dans des compartiments intracellulaires. Ces compartiments portant des marqueurs spécifiques des endosomes tardifs ou des MVB (Gendelman et al., 1988; Jouve et al., 2007; Orenstein et al., 1988; Pelchen-Matthews et al., 2003; Raposo et al., 2002) ont été décrits plus récemment comme étant des compartiments intracellulaires reliés à la membrane plasmique par des micro-canaux, les IPMC (*Intracellular Plasma Membrane-connected Compartments*) (Benaroch et al., 2010; Bennett et al., 2009; Deneka et al., 2007; Nkwe et al., 2016; Welsch et al., 2007). Peu de données sont disponibles sur l'observation à très haute résolution de clusters Gag-ARNg dans les macrophages. Il serait intéressant de déterminer si la formation des complexes Gag-ARNg est liée à leur localisation ou à leur proximité avec les IPMC et d'évaluer si les

particules virales présentes dans les IPMC ont efficacement encapsidé de l'ARNg. La MET et les approches utilisées dans cette étude pourraient permettre de répondre à ces questions. Des macrophages pourraient être infectés avec une souche virale AD8 puis la localisation de Gag et de l'ARNg pourrait être évaluée 5 j post-infection par un marquage anti-Gag et une hybridation *in situ* comme présenté en figure 39.

Gag et quelques clusters Gag-ARNg ont également été retrouvés dans le noyau des cellules, majoritairement à 12 h PT. Récemment, l'équipe de Parent a décrit la présence de complexes ribonucléoprotéiques formés de Gag, Rev et l'ARNg dans des régions discrètes du noyau des cellules HeLa ou JLat infectées (Tuffy et al., 2020). Cependant, ce phénotype reste mineur en comparaison avec la colocalisation retrouvée dans le cytoplasme et la membrane plasmique. De plus, la protéine eGFP dans cette étude est présente en position C-terminale de Gag, ce qui questionne sur la bonne capacité de localisation de Gag. En effet, l'équipe de Müller a démontré que les marqueurs fluorescents devaient être insérés en position C-terminale du domaine MA de Gag afin de perturber le moins possible l'assemblage viral. Par ailleurs, plusieurs autres équipes ayant décrit une colocalisation ou une formation de complexes Gag-ARNg dans le cytoplasme n'ont en revanche pas observé ces phénomènes dans le noyau (Hendrix et al., 2015 ; Ferrer et al., 2016 ; Boutant et al., 2020).

Une interaction cytoplasmique et nucléaire de Gag avec l'ARNg a par contre été décrite pour plusieurs autres rétrovirus, notamment RSV pour lequel Gag et l'ARNg s'associent plus précocement dans le noyau (Garbitt-Hirst et al., 2009; Stake et al., 2013). Le rôle du traffic nucléaire de Gag du VIH-1, s'il y en a un, reste donc à mieux définir. La formation de complexes nucléoprotéiques lors de l'assemblage du VIH-1 semblerait donc être initiée dans le cytoplasme cellulaire (ou dans le noyau), puis des molécules additionnelles de Gag seraient ajoutées à mesure de la migration de ces oligomères en direction de la membrane plasmique pour terminer l'assemblage et initier le bourgeonnement viral.

L'aspect original de ces travaux réside aussi dans l'apport de données quantitatives par une analyse des images de MET. Pour cela, nous avons développé sur Matlab une méthode de détection des nanoparticules d'or présentes sur les images de MET en adaptant une méthode initialement utilisée pour une détection robuste de spots en microscopie à fluorescence (Olivo-Marin, 2002). Cela nous a permis d'évaluer une estimation de la distance entre Gag et l'ARNg en fonction du temps. La distance entre Gag et l'ARNg peut être supérieure à ce qu'elle est véritablement, puisque ces deux partenaires sont détectés indirectement avec deux anticorps et des nanoparticules d'or. La distance moyenne entre Gag et l'ARNg est d'environ 60 nm à 24 h PT, ce qui est en accord avec la taille des particules virales. Afin de valider cette distance et d'estimer la distribution de chaque partenaire, nous avons utilisé le mutant Gag-G2A qui a précédemment été démontré comme interagissant très fortement avec l'ARNg

(Becker and Sherer, 2017; Hendrix et al., 2015). La distance moyenne entre Gag-G2A et l'ARNg est d'environ 52 nm, ce qui confirme l'intérêt de notre méthode et confirme également que la formation des clusters Gag-ARNg est indépendant de la capacité d'ancrage de Gag dans la MP. De façon plus intéressante, grâce à nos expérimentations de MET nous montrons surtout que cette distance moyenne entre Gag et l'ARNg diminue significativement entre 12 h et 48 h PT (Table 5), suggérant que les complexes tendent à subir un phénomène de condensation au fur et à mesure du transport de leur transport vers la MP.

Un autre aspect de notre étude a été d'estimer le nombre de particules virales contenant de l'ARNg par rapport à celles n'en contenant pas. À 24 h PT, environ 25% des particules virales contiennent de l'ARNg et ce nombre augmente à 40% à 48 h PT. La majorité des particules virales sont donc « vides » et contiennent probablement des ARN cellulaires (Comas-Garcia et al., 2017; Dilley et al., 2017; Houzet et al., 2007; Muriaux et al., 2001; Rulli et al., 2007). Une étude de Sardo et al. a été réalisée dans des conditions similaires aux nôtres, dans des cellules HeLa et apportant Gag à la fois en *cis* et en *trans*. Ils démontrent par TIRF que plus la quantité de Gag augmente, plus l'ARNg est retenu à la MP. Cette observation est en accord avec nos résultats étant donné qu'à 48h, où l'expression de Gag semble plus importante, une quantité supérieure d'ARNg est encapsidé dans les particules virales. Ils observent également, le taux d'ARNg recruté dans à la membrane plasmique pour être encapsidé passe de 13% à 34% selon la quantité de Gag présente (Sardo et al., 2015). Une hypothèse plausible est donc que l'encapsidation dépend de l'affinité des deux partenaires (ARNg et Gag) et que plus ils sont concentrés dans les cellules, plus leurs chances d'interagir et d'encapsider augmentent. Il serait intéressant d'investiguer plus précisément la quantité de particules virales contenant de l'ARNg en purifiant les particules virales puis de les normaliser sur la quantité de p24 avec un Western-blot et enfin de détecter spécifiquement par RT-qPCR les ARNg non-épissés.

L'utilisation de la MET pour la description des mutants de Gag et de l'ARNg a permis de mesurer finement les distances séparant ces deux partenaires (Table 5). Ces valeurs obtenues sont inférieures à la limite de résolution du microscope confocal mais comparables à la taille d'un virus. Afin d'évaluer les mutants présents dans cette étude, nous les avons classés dans deux groupes majeurs selon les distances mesurées. Ainsi, le premier groupe comprend des mutants ayant des distances inférieures à 80 nm, soulignant un regroupement entre Gag et l'ARNg et donc de la formation d'un complexe. Le second groupe regroupe les mutants ayant des distances supérieures à 80 nm, soulignant une absence de reconnaissance de Gag et de l'ARNg et la non formation de complexes.

Dans le premier groupe de faibles distances (<80 nm) sont retrouvés la condition sauvage Gag-WT, et les mutants Gag-G2A, Gag-ΔSL1 et Gag-Δp6. Gag-G2A est statistiquement très similaire à la condition Gag-WT. Le mutant présente même une distance légèrement inférieure au WT, qui pourrait souligner une condensation plus importante des complexes nucléoprotéiques. Cela pourrait être dû à un défaut d'assemblage de Gag-G2A qui ne s'ancre pas à la membrane plasmique, rendant ainsi une meilleure accessibilité du domaine NC de Gag lors de l'interaction Gag-ARNg. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser le mutant WM connu pour présenter un défaut d'oligomérisation de Gag (Datta et al., 2007).

Le mutant ARNg-ΔSL1 est également dans ce groupe car il n'est pas statistiquement différent de Gag-WT. La délétion de la boucle SL1 seule n'a pas un impact significatif sur la formation des complexes nucléoprotéiques observé dans nos conditions. Ce résultat est étonnant puisque la délétion de SL1 s'est traduite chez d'autres auteurs par une diminution significative de la quantité d'ARNg encapsidé (Paillart et al., 1996 ; Ferrer et al., 2016). L'étude de Paillart a été réalisée avec des cellules Cos infectées avec des virions possédant un ARNg ne possédant pas SL1, dont la délétion est similaire à la notre (Paillart et al., 1996). Cependant, lorsqu'ils réalisent une transfection de ce mutant dans les cellules Cos, ils n'obtiennent aucune différence significative avec la condition sauvage, comme nous l'avons observé dans notre étude. L'étude de Ferrer décrit un défaut d'encapsidation de l'ARNg-ΔSL1, mais dans le cas d'une cotransfection de l'ARNg-WT et de l'ARNg ΔSL1 dans des cellules HeLa (Ferrer et al., 2016). Cependant, ces expériences ont été réalisées avec une quantité de plasmide de 2 µg de plasmide pour deux millions de cellules, ce qui est cinq fois inférieur à nos conditions. De plus, l'équipe de Berkhout à décrit que des transfections avec de faibles quantités de plasmides mutant ne permettait pas la production de virus (Berkhout and van Wamel, 1996), ce qui pourrait expliquer les différences entre nos conditions et la littérature.

Le mutant Gag-Δp6 est également classé dans le premier groupe, puisqu'il est statistiquement similaire à Gag-WT. Ce résultat suggère que la délétion de ce domaine a un effet minime sur l'encapsidation du génome. Ce résultat est en accord avec l'analyse des particules virales produites par des cellules HEK293T montrant par PCR que GagΔp6 est toujours capable d'encapsider une quantité d'ARN Psi+ équivalente à celle de Gag (Sarni et al., 2020). Cependant deux autres publications ont proposé un rôle potentiel de p6 dans la reconnaissance spécifique de l'ARN viral en travaillant *in vitro* sur des oligomères de Gag purifiés et des ARN (ou ADN) (Dubois et al., 2018 ; Tanwar et al., 2018). Il est probable que les différences entre nos résultats, ceux du groupe de Musier-Forsyth et de ces deux rapports sont dues aux conditions expérimentales. En effet, *in vitro* le rapport protéine/AN reste contrôlé ainsi que l'oligomérisation de Gag en oligomère de petite taille (dimère à pentamère) (Dubois

et al., 2018). Inversement, en milieu cellulaire Gag s'assemble en polymères de grande taille augmentant considérablement sa concentration locale et réduisant les différences d'affinités potentielles entre Gag ou GagΔp6 pour les ARN délétés de la région Psi.

A l'interface du premier et du second groupe de distances est retrouvé le mutant du résidu aromatique du premier motif dactyle, Gag-F16A avec une distance de 78 nm. Ce mutant est statistiquement peu différent de Gag-WT, avec une p value peu significative (<0,05) et une taille d'effet intermédiaire de 0,62. De plus, ce mutant possède des quantités d'ARNg encapsidés (18%) légèrement plus faibles que pour Gag-WT (25%). La mutation du résidu phénylalanine du premier motif dactyle du domaine NC semble ainsi ne pas avoir un effet majeur sur la formation des complexes nucléoprotéiques. Sa mutation tend à diminuer de façon intermédiaire la distance entre Gag et l'ARN ainsi que l'encapsidation du génome, soulignant que ce résidu n'est pas le plus important dans ces processus.

Les mutants inclus dans le second groupe de grandes distances (>80 nm) sont GagΔNC, GagΔZF1ΔZF2, Gag-W37A, Gag-F16AW37A, Gag-H23C, Gag-H44C, Gag-H23CH44C, et l'ARNgΔSL1ΔSL3.

Pour les mutants Gag-ΔNC et Gag- ΔZF1ΔZF2, la distance entre Gag et l'ARNg augmente vers 100 nm, ce qui statistiquement très différent de Gag-WT. Les particules virales formées par ces deux mutants ne contiennent pas d'ARNg. Ces résultats attendus montrent la grande importance de la NC et de ces deux motifs dactyles pour une encapsidation spécifique de l'ARNg viral. Ils sont en accord avec la nette diminution de colocalisation entre Gag et l'ARNg observé par 3D-SIM (Ferrer et al., 2016) et par FLIM/FRET (Boutant et al., 2020).

Les mutants Gag-W37A et Gag-F16AW37A sont également retrouvés dans le second groupe avec des distances supérieures à 90 nm, qui sont statistiquement très différentes de Gag-WT. Le taux d'ARNg encapsidé pour ces mutants chute considérablement, 9% pour Gag-W37A et 14% pour Gag-F16AW37A. De façon intéressante, ces résultats illustrent que les résidus aromatiques des deux doigts de zinc ne semblent pas tout à fait identiques dans les processus de formation des complexes nucléoprotéiques et d'encapsidation de l'ARNg, puisque les mutations ponctuelles présentes sur le second motif dactyle semblent avoir plus d'impact que celles du premier motif dactyle. Il a été reporté dans la littérature que les deux doigts de zinc n'auraient pas la même fonction dans le trafic intracellulaire du complexe ribonucléoprotéique et dans l'assemblage du VIH-1 (Aldovini and Young, 1990; Boutant et al., 2020; Gorelick et al., 1993; Schwartz et al., 1997). Ces résultats sont supportés par des études récentes de RMN montrant que le ZF2 est plus susceptible d'interagir avec l'ARNg que ZF1 (Retureau et al., 2019). Il serait donc intéressant de confirmer ces observations avec notre

approche de MET en étudiant les distances obtenues pour une délétion du second motif dactyle uniquement.

Les mutants des histidines Gag-H23C, Gag-H44C et le double mutant Gag-H23CH44C sont également dans ce groupe, avec des distances d'environ 85 nm. Le taux d'ARNg chute légèrement pour ces deux mutants avec 22% pour Gag-H23C et 14% pour Gag-H44C. Il est à noter que les mutations ponctuelles dans chaque doigt de zinc n'ont pas un effet aussi important que la délétion complète des deux doigts de zinc. De fait, la perte des deux acides aminés aromatiques ou la modification structurale de la NC (mutant H/C) pourrait être partiellement compensée par la présence d'autres résidus dans le plateau hydrophobe incluant les résidus V13, F16, I24, A25 dans ZF1 et W37, G45 et M46 dans ZF2, qui renforcent l'interaction entre NC et l'ARN (De Guzman, 1998; Morellet et al., 1998). Ces résultats obtenus des mutants ponctuels soulignent l'importance des résidus aromatiques et des histidines de la NC, et donc de la structure des motifs dactyles, dans la formation des complexes nucléoprotéiques. Ces deux types de mutations (aromatiques ou ligands du zinc) ont en commun d'affecter la formation du plateau hydrophobe indispensable à l'interaction NC-acide nucléique.

Une observation étonnante dans cette étude est que le mutant Gag-H23CH44C forme très peu de particules virales dans les cellules HeLa, comme montré par l'analyse Western-Blot. Les quelques virus observés semblent retenus à la membrane plasmique (Figure 41 C). Ce phénomène de diminution de la libération de virions Gag-H23CH44C produits par la cellule a déjà été observé (Didierlaurent et al., 2008). De plus, plusieurs équipes ont également mis en évidence un défaut de bourgeonnement lorsque le domaine NC ou les doigts de zinc sont mutés (Grigorov et al., 2007; Popov et al., 2008) normalement observés pour des mutants de la séquence PTAP, ce qui souligne la relation fonctionnelle entre NC et p6. En effet, un modèle a été proposé dans lequel NC coopère avec le domaine PTAP de p6 pour le recrutement d'ALIX (Dussupt et al., 2009; Popov et al., 2008) et de Tsg101 (Chamontin et al., 2015; El Meshri et al., 2018). Dans le contexte de notre étude, nous pouvons avancer l'hypothèse que la mutation des histidines H23 et H44 ayant modifié la structure de doigts de zinc, l'interaction entre NCp15 et les protéines ALIX et Tsg101 pourrait s'en être retrouvé altérée réduisant ainsi la libération des virus de la membrane cellulaire. La technique de MET utilisée dans cette étude pourrait permettre de visualiser la présence ou l'absence de Tsg101 dans des cellules HeLa transfectées avec ce mutant et d'évaluer la formation de clusters avec Gag à la membrane plasmique et dans les particules virales. Nous disposons au laboratoire des constructions Tsg101 et ALIX sous forme de protéine HA et fluorescentes, qui sont facilement transfectables dans ces cellules. Cela permettrait leur détection par imagerie optique (FLIM, FRET) accompagnée d'un immunomarquage avec des nanoparticules d'or de Gag, Tsg 101 et Alix grâce à des anticorps anti-p24, anti-GFP et anti-HA, qui sont déjà utilisés

en immunogold. Des méthodes biochimiques d'immunoprécipitation ou de GST-pull down en attrapant la protéine Gag pourront compléter les observations réalisées en imagerie.
Enfin, le mutant ARNg-ΔSL1ΔSL3 est également classé dans ce dernier groupe puisqu'il possède une très grande distance (113 nm) accompagné d'une encapsidation diminuée de l'ARNg (16%). Cela illustre l'implication des tiges-boucles SL1 et SL3 dans les processus de formation des complexes nucléoprotéiques et d'encapsidation, comme cela a déjà été observé par plusieurs autres équipes (Clever and Parslow, 1997; Didierlaurent et al., 2011; Harrison et al., 1998).

Certaines mutations de la NC (mutants Gag-ΔNC et Gag-ΔZF1ΔZF2) conduisent à une perte totale de l'encapsidation de l'ARNg. Ces mutations ne sont pas compensées par la présence de MA. Cela sous-entend que seule la NC est responsable de cette encapsidation spécifique. Inversement, de nombreux sites de haute affinité pour Gag ont été trouvé dans l'ARNg, notamment au niveau LTR mais aussi (TAR, Poly(A), SL2 et SL4) ainsi que le RRE (D'Souza et al., 2005 ; Kuzembayeva et al., 2014). L'équipe de Summers a récemment mis en évidence que le 5'UTR sous forme dimérique contient plus de vingt sites de liaison de haute affinité pour la NC (Ding et al., 2020) répartis dans une région d'environ 150 nt suffisante pour assurer l'encapsidation, le Psi^{CES} (Heng et al., 2012). Cela doit expliquer que la délétion de SL1 et de SL3 provoque une diminution significative mais jamais totale de la quantité de complexes nucléoprotéiques Gag-ARNg et de l'ARNg encapsidé. Cela confirme que d'autres sites d'affinité pour Gag sont présents sur l'ARNg, permettant l'encapsidation en l'absence de ces séquences. Désormais, il pourrait être intéressant d'évaluer les séquences précises du 5'UTR impliquées dans l'encapsidation de l'ARNg en mutant finement les sites de haute affinité de la NC et d'apprécier si l'encapsidation de l'ARNg est altérée.

Plusieurs autres protéines virales sont impliquées dans les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1. C'est notamment le cas de l'intégrase, dont un rôle inattendu dans la morphogenèse virale a récemment été identifié, ouvrant la porte à de nouvelles options thérapeutiques (Elliott et al., 2020; Elliott and Kutluay, 2020). En effet, il a été démontré que l'intégrase se lie à l'ARNg dans les virions, permettant le placement correct du génome viral dans la capside virale (Kessl et al., 2016). Cette interaction s'avère nécessaire pour la morphogenèse et la maturation du virus, étant donné que la délétion de l'intégrase abouti à une localisation du génome viral hors de la capside virale, accompagné d'une dégradation prématurée dans les cellules infectées (Engelman et al., 1995; Kessl et al., 2016). Ces particules virales dénommés « particules eccentriques », sont morphologiquement distinctes des virions immatures et sont incapables de réaliser la transcription inverse dans les cellules infectées

(Elliott and Kutluay, 2020; Fontana et al., 2015; van Bel et al., 2014). De nombreuses questions sont désormais ouvertes, telles que la relation entre l'interaction IN/ARNg et la multimérisation de l'intégrase et le lien dans la morphogenèse virale. Le système de marquage des partenaires viraux par microscopie électronique de notre étude pourrait permettre de détecter la présence de l'intégrase dans les complexes nucléoprotéiques présents dans le cytoplasme, à la membrane plasmique ou bien encore dans les virions néoformés, grâce la transfection de l'intégrase du VIH-1 et de l'ARNg, suivi d'un double marquage de ces deux partenaires ou encore un triple marquage de l'intégrase, de l'ARNg et de la protéine Gag.

Pour conclure, les données présentées dans cette étude apportent une vision complémentaire du mécanisme d'assemblage du VIH-1 grâce à la localisation cellulaire précise des complexes formés entre Gag et l'ARNg. L'observation à haute résolution et à différents temps post-transcription nous permet de proposer que le complexe nucléoprotéine se forme dans le cytoplasme puis que ce complexe se condense et migre progressivement vers la membrane plasmique. Les deux motifs dactyles ne semblent pas rigoureusement équivalents puisque les mutations ponctuelles menées dans le doigt distal ont un effet significativement plus important que celles du doigt proximal lors de l'encapsidation de l'ARNg. Cette technique pourrait maintenant être utilisée pour décrire l'assemblage d'HIV dans les macrophages ou dans le cadre d'autres études d'interaction protéines/protéines ou protéines/acides nucléiques lors de morphogenèses virales.

BIBLIOGRAPHIE

Abbink, T.E.M., Berkhout, B., 2003. A Novel Long Distance Base-pairing Interaction in Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Occludes the Gag Start Codon. J. Biol. Chem. 278, 11601–11611. https://doi.org/10.1074/jbc.M210291200

Abbink, T.E.M., Ooms, M., Haasnoot, P.C.J., Berkhout, B., 2005. The HIV-1 Leader RNA Conformational Switch Regulates RNA Dimerization but Does Not Regulate mRNA Translation. Biochemistry 44, 9058–9066. https://doi.org/10.1021/bi0502588

Abd El-Wahab, E.W., Smyth, R.P., Mailler, E., Bernacchi, S., Vivet-Boudou, V., Hijnen, M., Jossinet, F., Mak, J., Paillart, J.-C., Marquet, R., 2014. Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. Nat. Commun. 5, 4304. https://doi.org/10.1038/ncomms5304

Abraham, L., Fackler, O.T., 2012. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. Cell Commun. Signal. 10, 39. https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-39

Abrahamyan, L.G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M.P., Monette, A., Clément, 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. https://doi.org/10.1242/jcs.055897

Abram, M.E., Ferris, A.L., Das, K., Quinoñes, O., Shao, W., Tuske, S., Alvord, W.G., Arnold, E., Hughes, S.H., 2014. Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Affect the Errors Made in a Single Cycle of Viral Replication. J. Virol. 88, 13.

Accola, M.A., Glund, S.H., Ttlinger, H.G.G., 1998. A Putative ـ-Helical Structure Which Overlaps the Capsid-p2 Boundary in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Precursor Is Crucial for Viral Particle Assembly. J VIROL 72, 7.

Accola, M.A., Öhagen, Å., Göttlinger, H.G., 2000. Isolation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cores: Retention of Vpr in the Absence of p6 ^{gag} . J. Virol. 74, 6198–6202. https://doi.org/10.1128/JVI.74.13.6198-6202.2000

Adamson, C.S., Freed, E.O., 2007. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly, Release, and Maturation, in: Advances in Pharmacology. Elsevier, pp. 347–387. https://doi.org/10.1016/S1054-3589(07)55010-6

Aiken, C., 2009. Cell-Free Assays for HIV-1 Uncoating, in: Prasad, V.R., Kalpana, G.V. (Eds.), HIV Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 41–53. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-170-3_4

Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., Trono, D., 1994. Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. Cell 76, 853–864. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90360-3

Aldovini, A., Young, R.A., 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. J. Virol. 64, 1920–1926. https://doi.org/10.1128/jvi.64.5.1920-1926.1990

Alfadhli, A., McNett, H., Tsagli, S., Bächinger, H.P., Peyton, D.H., Barklis, E., 2011. HIV-1 Matrix Protein Binding to RNA. J. Mol. Biol. 410, 653–666. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.063

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. https://doi.org/10.1128/JVI.01079-19

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M., Berger, E.A., 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 , MIP-1 Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. Science 272, 1955–1958. https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1955

Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Summers, M.F., 2000. NMR Structure of Stem-loop SL2 of the HIV-1 Psi RNA Packaging Signal Reveals a Novel A-U-A Base-triple Platform. J. Mol. Biol. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3710

Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D., Summers, M.F., 2001. Stem-loop SL4 of the HIV-1 Ψ RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. J. Mol. Biol. 314, 961–970. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.5182

Andersen, E.S., Contera, S.A., Knudsen, B., Damgaard, C.K., Besenbacher, F., Kjems, J., 2004. Role of the Trans-activation Response Element in Dimerization of HIV-1 RNA. J. Biol. Chem. 279, 22243–22249. https://doi.org/10.1074/jbc.M314326200

Anderson, E.C., Lever, A.M.L., 2006. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Modulates Its Own Translation. J. Virol. 80, 10478–10486. https://doi.org/10.1128/JVI.02596-05

Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. Retrovirology 7, 96. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-96

Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C.C., Censoplano, N., Chung, E., Reitano, K.N., Kottilil, S., Goode, D.J., Fauci, A.S., 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin α4β7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. Nat. Immunol. 9, 301–309. https://doi.org/10.1038/ni1566

Arts, E.J., Hazuda, D.J., 2012. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a007161–a007161. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161

Athavale, S.S., Ouyang, W., McPike, M.P., Hudson, B.S., Borer, P.N., 2010. Effects of the Nature and Concentration of Salt on the Interaction of the HIV-1 Nucleocapsid Protein with SL3 RNA. Biochemistry 49, 3525–3533. https://doi.org/10.1021/bi901279e

Bachand, F., Yao, X.-J., Hrimech, M., Rougeau, N., Cohen, É.A., 1999. Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires a Direct Interaction with the p6 Domain of the p55 Gag Precursor. J. Biol. Chem. 274, 9083–9091. https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.9083

Balasubramaniam, M., Freed, E.O., 2011. New Insights into HIV Assembly and Trafficking. Physiology 26, 236–251. https://doi.org/10.1152/physiol.00051.2010

Bampi, C., 2004. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1668–1686. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.024

Bannwarth, S., Gatignol, A., 2005. HIV-1 TAR RNA: The Target of Molecular Interactions Between the Virus and its Host. Curr. HIV Res. 3, 61–71. https://doi.org/10.2174/1570162052772924

Barin, F., Denis, F., Allan, J.S., M'Boup, S., Kanki, P., Lee, T.H., Essex, M., 1985. Serological Evidence for Virus Related To Simian T-Lymphotropic Retrovirus Iii in Residents of West Africa. The Lancet 326, 1387–1389. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)92556-5

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 56, 126–129.

Basyuk, E., Galli, T., Mougel, M., Blanchard, J.-M., Sitbon, M., Bertrand, E., 2003. Retroviral Genomic RNAs Are Transported to the Plasma Membrane by Endosomal Vesicles. Dev. Cell 5, 161–174. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00188-6

Bazzi, A., Zargarian, L., Chaminade, F., Boudier, C., De Rocquigny, H., René, B., Mély, Y., Fossé, P., Mauffret, O., 2011. Structural insights into the cTAR DNA recognition by the HIV-1 nucleocapsid protein: role of sugar deoxyriboses in the binding polarity of NC. Nucleic Acids Res. 39, 3903–3916. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1290

Becker, J.T., Sherer, N.M., 2017. Subcellular Localization of HIV-1 gag-pol mRNAs Regulates Sites of Virion Assembly. J. Virol. 91, e02315-16, e02315-16. https://doi.org/10.1128/JVI.02315-16

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. 117, 21637–21646. https://doi.org/10.1073/pnas.2008156117

Beerens, N., Berkhout, B., 2002. The tRNA Primer Activation Signal in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Is Important for Initiation and Processive Elongation of Reverse Transcription. J. Virol. 76, 2329–2339. https://doi.org/10.1128/jvi.76.5.2329-2339.2002

Bell, N.M., Lever, A.M.L., 2013. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. Trends Microbiol. 21, 136–144. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006

Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., Jouve, M., 2010. HIV-1 assembly in macrophages. Retrovirology 7, 29. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-29

Bennett, A.E., Narayan, K., Shi, D., Hartnell, L.M., Gousset, K., He, H., Lowekamp, B.C., Yoo, T.S., Bliss, D., Freed, E.O., Subramaniam, S., 2009. Ion-Abrasion Scanning Electron Microscopy Reveals Surface-Connected Tubular Conduits in HIV-Infected Macrophages. PLoS Pathog. 5, e1000591. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000591

Berg, J., 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science 232, 485–487. https://doi.org/10.1126/science.2421409

Berkhout, B., van Wamel, J.L., 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 70, 6723–6732. https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6723-6732.1996

Berkhout, B., Vastenhouw, N.L., Klasens, B.I.F., Huthoff, H., 2001. Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription. RNA 7, 1097–1114. https://doi.org/10.1017/S1355838201002035

Berkhout B. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1996;54:1-34. doi: 10.1016/s0079-6603(08)60359-1. PMID: 8768071.

Berkhout B, Klaver B, Das AT. A conserved hairpin structure predicted for the poly(A) signal of human and simian immunodeficiency viruses. Virology. 1995 Feb 20;207(1):276-81. doi: 10.1006/viro.1995.1077. Erratum in: Virology 1995 May 10;209(1):284. PMID: 7755727.

Berkowitz, R.D., Ohagen, A., Höglund, S., Goff, S.P., 1995. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. J. Virol. 69, 6445–6456. https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.6445-6456.1995

Berkowitz RD, Goff SP. Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein. Virology. 1994 Jul;202(1):233-46. doi: 10.1006/viro.1994.1339. PMID: 8009834.

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 binds genomic and spliced RNAs with different affinity and stoichiometry. RNA Biol. 14, 90–103. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1256533

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., Long, R.M., 1998. Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast. Mol. Cell 2, 437–445. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80143-4

Bess, J.W., Powell, P.J., Issaq, H.J., Schumack, L.J., Grimes, M.K., Henderson, L.E., Arthur, L.O., 1992. Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses. J. Virol. 66, 840–847. https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.840-847.1992

Blanco-Rodriguez, G., Gazi, A., Monel, B., Frabetti, S., Scoca, V., Mueller, F., Schwartz, O., Krijnse-Locker, J., Charneau, P., Di Nunzio, F., 2020. Remodeling of the core leads HIV-1 pre-integration complex in the nucleus of human lymphocytes (preprint). Microbiology. https://doi.org/10.1101/2020.01.24.918383

Bolinger, C., Boris-Lawrie, K., 2009. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. Retrovirology 6, 8. https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-8

Boutant, E., Bonzi, J., Anton, H., Nasim, M.B., Cathagne, R., Réal, E., Dujardin, D., Carl, P., Didier, P., Paillart, J.-C., Marquet, R., Mély, 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. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.035

Brady, J., Kashanchi, F., 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. Retrovirology 2, 69. https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-69

Brandt, S., Blißenbach, M., Grewe, B., Konietzny, R., Grunwald, T., Überla, K., 2007. Rev Proteins of Human and Simian Immunodeficiency Virus Enhance RNA Encapsidation. PLoS Pathog. 3, e54. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030054

Bratt, G., Leandersson, A.-C., Albert, J., Sandström, E., Wahren, B., 1998. MT-2 tropism and CCR-5 genotype strongly influence disease progression in HIV-1-infected individuals: AIDS 12, 729–736. https://doi.org/10.1097/00002030-199807000-00009

Briggs, J.A.G., Kräusslich, H.-G., 2011. The Molecular Architecture of HIV. J. Mol. Biol. 410, 491–500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.021

Brumme, Z.L., Goodrich, J., Mayer, H.B., Brumme, C.J., Henrick, B.M., Wynhoven, B., Asselin, J.J., Cheung, P.K., Hogg, R.S., Montaner, J.S.G., Harrigan, P.R., 2005. Molecular and Clinical Epidemiology of CXCR4-Using HIV-1 in a Large Population of Antiretroviral-Naive Individuals. J. Infect. Dis. 192, 466–474. https://doi.org/10.1086/431519

Buckman, J.S., Bosche, W.J., Gorelick, R.J., 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Zn2ℰ Fingers Are Required for Efficient Reverse Transcription, Initial Integration Processes, and Protection of Newly Synthesized Viral DNA. J VIROL 77, 12.

Bukrinskaya, A., 2007. HIV-1 matrix protein: A mysterious regulator of the viral life cycle. Virus Res. 124, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.001

Bukrinsky, M., 2004. A Hard Way to the Nucleus. Mol. Med. 10, 1–5. https://doi.org/10.1007/BF03401996

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. 117, 5486–5493. https://doi.org/10.1073/pnas.1920631117

Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P., Luban, J., 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Multimerization Requires the Nucleocapsid Domain and RNA and Is Promoted by the Capsid-Dimer Interface and the Basic Region of Matrix Protein. J. Virol. 73, 8527–8540. https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8527-8540.1999

Butsch, M., Boris-Lawrie, K., 2000. Translation Is Not Required To Generate Virion Precursor RNA in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected T Cells. J. Virol. 74, 11531–11537. https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11531-11537.2000

Campbell, S., Rein, A., 1999. In Vitro Assembly Properties of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Lacking the p6 Domain. J. Virol. 73, 2270–2279. https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2270-2279.1999

Campbell, S., Vogt, V.M., 1995. Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 69, 6487–6497. https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.6487-6497.1995

Campbell-Yesufu, O.T., Gandhi, R.T., 2011. Update on Human Immunodeficiency Virus (HIV)-2 Infection. Clin. Infect. Dis. 52, 780–787. https://doi.org/10.1093/cid/ciq248

Camus, G., Segura-Morales, C., Molle, D., Lopez-Verges, S., Begon-Pescia, C., Cazevieille, C., Schu, P., Bertrand, E., Berlioz-Torrent, C., Basyuk, E., 2007. The Clathrin Adaptor Complex AP-1 Binds HIV-1 and MLV Gag and Facilitates Their Budding□D. Mol. Biol. Cell 18, 11.

Carteau, S., Batson, S.C., Poljak, L., Mouscadet, J.-F.O., Darlix, J.-L., 1997. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Specifically Stimulates Mg2+-Dependent DNA Integration In Vitro. J VIROL 71, 5.

Chamontin, C., Rassam, P., Ferrer, M., Racine, P.-J., Neyret, A., Lainé, S., Milhiet, P.-E., Mougel, M., 2015. HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. Nucleic Acids Res. 43, 336–347. https://doi.org/10.1093/nar/gku1232

Chatel-Chaix, L., Clément, J.-F., Martel, C., Bériault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., Mouland, A.J., 2004. Identification of Staufen in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ribonucleoprotein Complex and a Role in Generating Infectious Viral Particles. Mol. Cell. Biol. 24, 2637–2648. https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2637-2648.2004

Checkley, M.A., Luttge, B.G., Freed, E.O., 2011. HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. J. Mol. Biol. 410, 582–608. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042

Chen, J., Grunwald, D., Sardo, L., Galli, A., Plisov, S., Nikolaitchik, O.A., Chen, D., Lockett, S., Larson, D.R., Pathak, V.K., Hu, W.-S., 2014. Cytoplasmic HIV-1 RNA is mainly transported by diffusion in the presence or absence of Gag protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, E5205–E5213. https://doi.org/10.1073/pnas.1413169111

Chen, J., Nikolaitchik, O., Singh, J., Wright, A., Bencsics, C.E., Coffin, J.M., Ni, N., Lockett, S., Pathak, V.K., Hu, W.-S., 2009. High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 13535–13540. https://doi.org/10.1073/pnas.0906822106

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. 113, E201–E208. https://doi.org/10.1073/pnas.1518572113

Chen, Y., Wu, B., Musier-Forsyth, K., Mansky, L.M., Mueller, J.D., 2009. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy on Viral-Like Particles Reveals Variable Gag Stoichiometry. Biophys. J. 96, 1961–1969. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.067

Chin, C.R., Perreira, J.M., Savidis, G., Portmann, J.M., Aker, A.M., Feeley, E.M., Smith, M.C., Brass, A.L., 2015. Direct Visualization of HIV-1 Replication Intermediates Shows that Capsid and CPSF6 Modulate HIV-1 Intra-nuclear Invasion and Integration. Cell Rep. 13, 1717–1731. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.036

Chukkapalli, V., Hogue, I.B., Boyko, V., Hu, W.-S., Ono, A., 2008. Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding. J. Virol. 82, 2405–2417. https://doi.org/10.1128/JVI.01614-07

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. 107, 1600–1605. https://doi.org/10.1073/pnas.0908661107

Chukkapalli, V., Ono, A., 2011. Molecular Determinants that Regulate Plasma Membrane Association of HIV-1 Gag. J. Mol. Biol. 410, 512–524. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.015

Cimarelli, A., Luban, J., 2000. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion Density Is Not Determined by Nucleocapsid Basic Residues. J. Virol. 74, 6734–6740. https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6734-6740.2000

Clapham, P.R., Weiss, R.A., 1997. Spoilt for choice of co-receptors. Nature 388, 230–231. https://doi.org/10.1038/40758

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M., Laurent, A., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., al., e., 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 233, 343–346. https://doi.org/10.1126/science.2425430

Clavel, F., Orenstein, J.M., 1990. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. J. Virol. 64, 5230–5234. https://doi.org/10.1128/jvi.64.10.5230-5234.1990

Clever, J., Sassetti, C., Parslow, T.G., 1995. RNA Secondary Structure and Binding Sites for gag Gene Products in the 5J Packaging Signal of Human Immunodeficiency Virus Type. J VIROL 69, 9.

Clever, J.L., Eckstein, D.A., Parslow, T.G., 1999. Genetic Dissociation of the Encapsidation and Reverse Transcription Functions in the 5J R Region of Human Immunodeficiency Virus Type. J VIROL 73, 9.

Clever, J.L., Miranda, D., Parslow, T.G., 2002. RNA Structure and Packaging Signals in the 5J Leader Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. J VIROL 76, 7.

Clever, J.L., Parslow, T.G., 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. J. Virol. 71, 3407–3414. https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3407-3414.1997

Clever, J.L., Wong, M.L., Parslow, T.G., 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. J. Virol. 70, 5902–5908. https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.5902-5908.1996

Cockrell, A.S., van Praag, H., Santistevan, N., Ma, H., Kafri, T., 2011. The HIV-1 Rev/RRE system is required for HIV-1 5' UTR cis elements to augment encapsidation of heterologous RNA into HIV-1 viral particles. Retrovirology 8, 51. https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-51

Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., Haynes, B.F., 2011. Acute HIV-1 Infection. N. Engl. J. Med. 364, 1943–1954. https://doi.org/10.1056/NEJMra1011874

Comas-Garcia, M., Datta, S.A., Baker, L., Varma, R., Gudla, P.R., Rein, A., 2017. Dissection of specific binding of HIV-1 Gag to the "packaging signal" in viral RNA. eLife 6, e27055. https://doi.org/10.7554/eLife.27055

Comas-Garcia, M., Davis, S., Rein, A., 2016. On the Selective Packaging of Genomic RNA by HIV-1. Viruses 8, 246. https://doi.org/10.3390/v8090246

Comas-Garcia, M., Kroupa, T., Datta, S.A., Harvin, D.P., Hu, W.-S., Rein, A., 2018. Efficient support of virus-like particle assembly by the HIV-1 packaging signal. eLife 7, e38438. https://doi.org/10.7554/eLife.38438

Craigie, R., Bushman, F.D., 2012. HIV DNA Integration. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006890–a006890. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890

Cuevas, J.M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J., Sanjuán, R., 2015. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. PLOS Biol. 13, e1002251. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251

Cullen, B.R., 2005. Nuclear RNA export unwound. Nature 433, 26–27. https://doi.org/10.1038/433026a

Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., Weiss, R.A., 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 312, 763–767. https://doi.org/10.1038/312763a0

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. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.12.010

Dannull, J., Surovoy, A., Jung, G., Moelling, K., 1994. Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues. EMBO J. 13, 1525–1533. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06414.x

D'arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., Madinda, N.F., Robbins, M.M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V.A., Sharp, P.M., Hahn, B.H., Delaporte, E., Mpoudi Ngole, E., Peeters, M., 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, E1343–E1352. https://doi.org/10.1073/pnas.1502022112

Darlix, J.-L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fossé, P., Mauffret, O., Mély, Y., 2011. Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. J. Mol. Biol. 410, 565–581. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.037

Darlix, J.-L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H., Roques, B.P., 1995. First Glimpses at Structure-function Relationships of the Nucleocapsid Protein of Retroviruses. J. Mol. Biol. 254, 523–537. https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0635

Das, A.T., Klaver, B., Berkhout, B., 1999. A Hairpin Structure in the R Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Genome Is Instrumental in Polyadenylation Site Selection. J. Virol. 73, 81–91. https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.81-91.1999

Das, A.T., Klaver, B., Berkhout, B., 1998. The 5J and 3J TAR Elements of Human Immunodeficiency Virus Exert Effects at Several Points in the Virus Life Cycle. J VIROL 72, 7.

Das, A.T., Klaver, B., Klasens, B.I., van Wamel, J.L., Berkhout, B., 1997. A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. J. Virol. 71, 2346–2356. https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2346-2356.1997

Datta, S.A.K., Curtis, J.E., Ratcliff, W., Clark, P.K., Crist, R.M., Lebowitz, J., Krueger, S., Rein, A., 2007. Conformation of the HIV-1 Gag Protein in Solution. Journal of Molecular Biology 365, 812–824. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.073

Datta, S.A.K., Clark, P.K., Fan, L., Ma, B., Harvin, D.P., Sowder, R.C., 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. https://doi.org/10.1128/JVI.02061-15

Datta, S.A.K., 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. https://doi.org/10.1128/JVI.00006-11

Dawson, L., Yu, X.-F., 1998. The Role of Nucleocapsid of HIV-1 in Virus Assembly. Virology 251, 141–157. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9374

Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, Barré-Sinoussi F. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. J Mol Biol. 1990 5;216(3):689-99. doi: 10.1016/0022-2836(90)90392-Y. PMID: 2124274.

Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, Barré-Sinoussi F. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. J Mol Biol. 1990 5;216(3):689-99. doi: 10.1016/0022-2836(90)90392-Y. PMID: 2124274.

Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., Haseltine, W.A., Street, B., 1986. The Trans-Activator Gene of the Human T Cell Lymphotropic Virus Type Ill Is Required for Replication. Cell 44, 7.

de Araújo, M.E.G., Lamberti, G., Huber, L.A., 2015. Purification of Early and Late Endosomes. Cold Spring Harb. Protoc. 2015, pdb.top074443. https://doi.org/10.1101/pdb.top074443

De Guzman, R.N., 1998. Structure of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Bound to the SL3 -RNA Recognition Element. Science 279, 384–388. https://doi.org/10.1126/science.279.5349.384

De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. J. Virol. 64, 1207–16.

de Marco, A., Heuser, A.-M., Glass, B., Krausslich, H.-G., Muller, B., Briggs, J.A.G., 2012. Role of the SP2 Domain and Its Proteolytic Cleavage in HIV-1 Structural Maturation and Infectivity. J. Virol. 86, 13708–13716. https://doi.org/10.1128/JVI.01704-12

de Rocquigny, H., El Meshri, S.E., Richert, L., Didier, P., Darlix, J.-L., Mély, Y., 2014. Role of the nucleocapsid region in HIV-1 Gag assembly as investigated by quantitative fluorescence-based microscopy. Virus Res. 193, 78–88. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.009

De Rocquigny, H., Gabus, C., Vincent, A., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B., Darlix, J.L., 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 6472–6476. https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6472

Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., Mouscadet, J.-F., 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. Retrovirology 5, 114. https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114

Demene, H., Dong, C.Z., Ottmann, M., Rouyez, M.C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., 1994. 1H NMR structure and biological studies of the His23 .fwdarw. Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. Biochemistry 33, 11707–11716. https://doi.org/10.1021/bi00205a006

Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., Marsh, M., 2007. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. J. Cell Biol. 177, 329–341. https://doi.org/10.1083/jcb.200609050

Derdowski, A., Ding, L., Spearman, P., 2004. A Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay Demonstrates that the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pr55Gag I Domain Mediates Gag-Gag Interactions. J. Virol. 78, 1230–1242. https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1230-1242.2004

Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwikelmaier, 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. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0735-8

Didierlaurent, L., Houzet, L., Morichaud, Z., Darlix, J.-L., Mougel, M., 2008. The conserved N-terminal basic residues and zinc-finger motifs of HIV-1 nucleocapsid restrict the viral cDNA synthesis during virus formation and maturation. Nucleic Acids Res. 36, 4745–4753. https://doi.org/10.1093/nar/gkn474

Didierlaurent, L., Racine, P.J., Houzet, L., Chamontin, C., Berkhout, B., Mougel, 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. https://doi.org/10.1093/nar/gkr577

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. J. Virol. 91, e02319-16, e02319-16. https://doi.org/10.1128/JVI.02319-16

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. 117, 17737–17746. https://doi.org/10.1073/pnas.2008519117

Dong, X., Li, H., Derdowski, A., Ding, L., Burnett, A., Chen, X., Peters, T.R., Dermody, T.S., Woodruff, E., Wang, J.-J., Spearman, P., 2005. AP-3 Directs the Intracellular Trafficking of HIV-1 Gag and Plays a Key Role in Particle Assembly. Cell 120, 663–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.023

Dooher, J.E., Schneider, B.L., Reed, J.C., Lingappa, J.R., 2007. Host ABCE1 is at Plasma Membrane HIV Assembly Sites and Its Dissociation from Gag is Linked to Subsequent Events of Virus Production. Traffic 8, 195–211. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00524.x

Dorman, N., Lever, A., 2000. Comparison of Viral Genomic RNA Sorting Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), HIV-2, and Moloney Murine Leukemia Virus. J. Virol. 74, 11413–11417. https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.11413-11417.2000

Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Haase, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan#, J.L., Jamieson, B.D., Zack, J.A., Picker, L.J., Koup, R.A., 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. Nature 396, 690–695. https://doi.org/10.1038/25374

D'Souza, V., Summers, M.F., 2005. How retroviruses select their genomes. Nat. Rev. Microbiol. 3, 643–655. https://doi.org/10.1038/nrmicro1210

Dvorin JD, Malim MH, Intracellular trafficking of HIV-1 cores: journey to the center of the cell, Curr Top Microbiol Immunol, 2003;281:179-208, doi: 10,1007/978-3-642-19012-4_5, PMID: 12932078.

Dubois, N., Khoo, K.K., Ghossein, S., Seissler, T., Wolff, P., McKinstry, 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. https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1481696

Dussupt, V., Javid, M.P., Abou-Jaoudé, 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. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000339

Dussupt, V., Sette, P., Bello, N.F., Javid, M.P., Nagashima, K., Bouamr, F., 2011. Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Critical for Late Events of HIV-1 Budding. J. Virol. 85, 2304–2315. https://doi.org/10.1128/JVI.01562-10

El Meshri, S.E., Boutant, E., Mouhand, A., Thomas, A., Larue, V., Richert, L., Vivet-Boudou, V., Mély, Y., Tisné, C., Muriaux, D., de Rocquigny, H., 2018. The NC domain of HIV-1 Gag contributes to the interaction of Gag with TSG101. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1862, 1421–1431. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.020

El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mély, 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. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.015

Elliott, J.L., Eschbach, J.E., Koneru, P.C., Li, W., Puray-Chavez, M., Townsend, D., Lawson, D.Q., Engelman, A.N., Kvaratskhelia, M., Kutluay, S.B., 2020. Integrase-RNA interactions underscore the critical role of integrase in HIV-1 virion morphogenesis. eLife 9, e54311. https://doi.org/10.7554/eLife.54311

Elliott, J.L., Kutluay, S.B., 2020. Going beyond Integration: The Emerging Role of HIV-1 Integrase in Virion Morphogenesis. Viruses 12, 1005. https://doi.org/10.3390/v12091005

Emery, A., Swanstrom, R., 2021. HIV-1: To Splice or Not to Splice, That Is the Question. Viruses 13, 181. https://doi.org/10.3390/v13020181

Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J.M., Martin, M.A., Craigie, R., 1995. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. J. Virol. 69, 2729–2736. https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2729-2736.1995

Eggleton JS, Nagalli S, Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), 2020 Nov 9, In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–, PMID: 32119420

Ennifar E, Walter P, Ehresmann B, Ehresmann C, Dumas P. Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. Nat Struct Biol. 2001 Dec;8(12):1064-8. doi: 10.1038/nsb727. PMID: 11702070.

Ennifar, E., Paillart, J., Bernacchi, S., Walter, P., Pale, P., Decout, J., Marquet, R., Dumas, P., 2007. A structure-based approach for targeting the HIV-1 genomic RNA dimerization initiation site. Biochimie 89, 1195–1203. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.03.003

Ennifar, E., Yusupov, M., Walter, P., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Dumas, P., 1999. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. Structure 7, 1439–1449. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)80033-7

Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O.G., Lemey, P., 2014. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science 346, 56–61. https://doi.org/10.1126/science.1256739

Favard, C., Chojnacki, J., Merida, P., Yandrapalli, N., Mak, J., Eggeling, C., Muriaux, D., 2019. HIV-1 Gag specifically restricts PI(4,5)P2 and cholesterol mobility in living cells creating a nanodomain platform for virus assembly. Sci. Adv. 11.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A., 1996. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. Science 272, 872–877. https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872

Feng, Y.X., Copeland, T.D., Henderson, L.E., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Levin, J.G., Rein, A., 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 7577–7581. https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7577

Fernandes, J., Jayaraman, B., Frankel, A., 2012. The HIV-1 Rev response element: An RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. RNA Biol. 9, 6–11. https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18178

Ferrer, M., Clerté, C., Chamontin, C., Basyuk, E., Lainé, S., Hottin, J., Bertrand, E., Margeat, E., Mougel, M., 2016. Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. Nucleic Acids Res. 44, 7922–7934. https://doi.org/10.1093/nar/gkw511

Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrant, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H., Busch, M.P., 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS 17, 9. https://doi.org/10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8

Finzi, A., Orthwein, A., Mercier, J., Cohen, É.A., 2007. Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly Takes Place at the Plasma Membrane. J. Virol. 81, 7476–7490. https://doi.org/10.1128/JVI.00308-07

Fontana, J., Jurado, K.A., Cheng, N., Ly, N.L., Fuchs, J.R., Gorelick, R.J., Engelman, A.N., Steven, A.C., 2015. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. J. Virol. 89, 9765–9780. https://doi.org/10.1128/JVI.01522-15

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W., 1997. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. Cell 90, 1051–1060. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80371-2

Fossen, T., Wray, V., Bruns, K., Rachmat, J., Henklein, P., Tessmer, U., Maczurek, A., Klinger, P., Schubert, U., 2005. Solution Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 Protein. J. Biol. Chem. 280, 42515–42527. https://doi.org/10.1074/jbc.M507375200

Fouchier, R.A.M., Schuitemaker, H., 1996. Molecular determinants of human immunodeficiency virus type I phenotype variability. Eur. J. Clin. Invest. 26, 175–185. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1996.130266.x

Frange, P., Chaix, M.-L., Raymond, S., Galimand, J., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Rouzioux, C., Izopet, J., 2010. Low Frequency of CXCR4-Using Viruses in Patients at the Time of Primary Non-Subtype-B HIV-1 Infection. J. Clin. Microbiol. 48, 3487–3491. https://doi.org/10.1128/JCM.00704-10

Frange, P., Galimand, J., Goujard, C., Deveau, C., Ghosn, J., Rouzioux, C., Meyer, L., Chaix, M.-L., 2009. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. J. Antimicrob. Chemother. 64, 135–141. https://doi.org/10.1093/jac/dkp151

Frankel, A.D., Young, J.A.T., 1998. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. Annu. Rev. Biochem. 67, 1–25. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.1

Freed, E.O., 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. Nat. Rev. Microbiol. 13, 484–496. https://doi.org/10.1038/nrmicro3490

Freed, E.O., 2003. The HIV–TSG101 interface: recent advances in a budding field. Trends Microbiol. 11, 56–59. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00013-6

Friedman-Kien, A.E., 1981. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. J. Am. Acad. Dermatol. 5, 468–471. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(81)80010-2

Fritz, J.V., Dujardin, D., Godet, J., Didier, P., De Mey, J., Darlix, J.-L., Mély, Y., de Rocquigny, H., 2010. HIV-1 Vpr Oligomerization but Not That of Gag Directs the Interaction between Vpr and Gag. J. Virol. 84, 1585–1596. https://doi.org/10.1128/JVI.01691-09

Fujii, K., Munshi, U.M., Ablan, S.D., Demirov, D.G., Soheilian, F., Nagashima, K., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Freed, E.O., 2009. Functional role of Alix in HIV-1 replication. Virology 391, 284–292. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.016

Fusco, D., Accornero, N., Lavoie, B., Shenoy, S.M., Blanchard, J.-M., Singer, R.H., Bertrand, E., 2003. Single mRNA Molecules Demonstrate Probabilistic Movement in Living Mammalian Cells. Curr. Biol. 13, 161–167. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01436-7

Gamble, T.R., 1997. Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein. Science 278, 849–853. https://doi.org/10.1126/science.278.5339.849

Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., Pornillos, O., 2012. Assembly and Architecture of HIV, in: Rossmann, M.G., Rao, V.B. (Eds.), Viral Molecular Machines, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, Boston, MA, pp. 441–465. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_20

Garbitt-Hirst, R., Kenney, S.P., Parent, L.J., 2009. Genetic Evidence for a Connection between Rous Sarcoma Virus Gag Nuclear Trafficking and Genomic RNA Packaging. J. Virol. 83, 6790–6797. https://doi.org/10.1128/JVI.00101-09

Geigenmuller, U., Linial, M.L., 1996. Specific Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Gag-Derived Proteins to a 5J HIV-1 Genomic RNA Sequence. J VIROL 70, 5.

Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Martin, M.A., Ferrua, C., Mitra, R., Phipps, T., Wahl, L.A., Lane, H.C., Skillman, D., MELTZERl, M.S., 1988. EFFICIENT ISOLATION AND PROPAGATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS ON RECOMBINANT COLONY-STIMULATING FACTOR I-TREATED MONOCYTES. J. Exp. Med. 14.

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, Francotte, M., Thines, D., 1989. Assembly and Release of HIV-1 Precursor Pr5Wg Virus-like Particles from Recombinant Baculovirus-Infected Insect Cells. Cell 59, 10.

Gilbert, M.T.P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T.J., Pitchenik, A.E., Worobey, M., 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 18566–18570. https://doi.org/10.1073/pnas.0705329104

Giles, K.E., 2004. Packaging and reverse transcription of snRNAs by retroviruses may generate pseudogenes. RNA 10, 299–307. https://doi.org/10.1261/rna.2150604

Girard F, Barbault F, Gouyette C, Huynh-Dinh T, Paoletti J, Lancelot G. Dimer initiation sequence of HIV-1Lai genomic RNA: NMR solution structure of the extended duplex. J Biomol Struct Dyn. 1999 Jun;16(6):1145-57. doi: 10.1080/07391102.1999.10508323. PMID: 10447199.

Godet, J., Ramalanjaona, N., Sharma, K.K., Richert, L., de Rocquigny, H., Darlix, J.-L., Duportail, G., Mély, Y., 2011. Specific implications of the HIV-1 nucleocapsid zinc fingers in the annealing of the primer binding site complementary sequences during the obligatory plus strand transfer. Nucleic Acids Res. 39, 6633–6645. https://doi.org/10.1093/nar/gkr274

Goldschmidt, V., Rigourd, M., Ehresmann, C., Le Grice, S.F.J., Ehresmann, B., Marquet, R., 2002. Direct and Indirect Contributions of RNA Secondary Structure Elements to the Initiation of HIV-1 Reverse Transcription. J. Biol. Chem. 277, 43233–43242. https://doi.org/10.1074/jbc.M205295200

Gonzales, B., de Rocquigny, H., Beziau, A., Durand, S., Burlaud-Gaillard, J., Lefebvre, A., Krull, S., Emond, P., Brand, D., Piver, E., 2020. Type I Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinases α and γ Play a Key Role in Targeting HIV-1 Pr55 ^{Gag} to the Plasma Membrane. J. Virol. 94, e00189-20, /jvi/94/14/JVI.00189-20.atom. https://doi.org/10.1128/JVI.00189-20

González, M., 2015. Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. Viruses 7, 4352–4368. https://doi.org/10.3390/v7082824

Gorelick, R.J., Chabot, D.J., Rein, A., Henderson, L.E., Arthur, L.O., 1993. The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. J. Virol. 67, 4027–4036. https://doi.org/10.1128/JVI.67.7.4027-4036.1993

Gorelick, R.J., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Wiltrout, T.A., Coren, L.V., Chabot, D.J., Lifson, J.D., Henderson, L.E., Arthur, L.O., 1999. Strict Conservation of the Retroviral Nucleocapsid Protein Zinc Finger Is Strongly Influenced by Its Role in Viral Infection Processes: Characterization of HIV-1 Particles Containing Mutant Nucleocapsid Zinc-Coordinating Sequences. Virology 256, 92–104. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9629

Gorelick, R.J., Henderson, L.E., Hanser, J.P., Rein, A., 1988. Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8420–8424. https://doi.org/10.1073/pnas.85.22.8420

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., Saxon, A., 1981. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. N. Engl. J. Med. 305, 1425–1431. https://doi.org/10.1056/NEJM198112103052401

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. 88, 3195–3199. https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3195

Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5781–5785. https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5781

Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E., Freed, E.O., 2008. Real-Time Visualization of HIV-1 GAG Trafficking in Infected Macrophages. PLoS Pathog. 4, e1000015. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000015

Grandgenett, D.P., 2015. Multifunctional facets of retrovirus integrase. World J. Biol. Chem. 6, 83. https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.83

Grewe, B, Ehrhardt, K., Hoffmann, B., Blissenbach, M., Brandt, S., Überla, K., 2012. The HIV-1 Rev Protein Enhances Encapsidation of Unspliced and Spliced, RRE-Containing Lentiviral Vector RNA. PLoS ONE 7, e48688. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048688

Grewe, B., Hoffmann, B., Ohs, I., Blissenbach, M., Brandt, S., Tippler, B., Grunwald, T., Uberla, K., 2012. Cytoplasmic Utilization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Is Not Dependent on a Nuclear Interaction with Gag. J. Virol. 86, 2990–3002. https://doi.org/10.1128/JVI.06874-11

Grewe C, Beck A, Gelderblom HR, HIV: early virus-cell interactions, J Acquir Immune Defic Syndr (1988), 1990;3(10):965-74, PMID: 2398460,

Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.-L., Muriaux, D., 2006. Assembly of Infectious HIV-1 in Human Epithelial and T-Lymphoblastic Cell Lines. J. Mol. Biol. 359, 848–862. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.017

Grigorov, B., Décimo, D., Smagulova, F., Péchoux, C., Mougel, M., Muriaux, D., Darlix, J.-L., 2007. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. Retrovirology 4, 54. https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-54

Grivel, J.-C., Margolis, L.B., 1999. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. Nat. Med. 5, 344–346. https://doi.org/10.1038/6565

Gross, I., 2000. A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. EMBO J. 19, 103–113. https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.103

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. https://doi.org/10.1038/nm1380

Guenzel, C.A., Hérate, C., Benichou, S., 2014. HIV-1 Vpr—a still "enigmatic multitasker." Front. Microbiol. 5, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00127

Guo, J., Wu, T., Kane, B.F., Johnson, D.G., Henderson, L.E., Gorelick, R.J., Levin, J.G., 2002. Subtle Alterations of the Native Zinc Finger Structures Have Dramatic Effects on the Nucleic Acid Chaperone Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein. J. Virol. 76, 4370–4378. https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4370-4378.2002

Haddrick, M., Lear, A.L., Cann, A.J., Heaphy, S., 1996. Evidence that a Kissing Loop Structure Facilitates Genomic RNA Dimerisation in HIV-1. J. Mol. Biol. 259, 58–68. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0301

Hallenberger, S., Boscht, V., Angliker, H., Garten, W., 1992. Inhibition of turin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160 360, 4.

Harrich, D., Hooker, C.W., Parry, E., 2000. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR RNA Upper Stem-Loop Plays Distinct Roles in Reverse Transcription and RNA Packaging. J. Virol. 74, 5639–5646. https://doi.org/10.1128/JVI.74.12.5639-5646.2000

Harrison, G.P., Miele, G., Hunter, E., Lever, A.M.L., 1998. Functional Analysis of the Core Human Immunodeficiency Virus Type 1 Packaging Signal in a Permissive Cell Line. J. Virol. 72, 5886–5896. https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.5886-5896.1998

Hayashi, T., Ueno, Y., Okamoto, T., 1993. Elucidation of a conserved RNA stem-loop structure in the packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. FEBS Lett. 327, 213–218. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80172-Q

Hayashi T, Shioda T, Iwakura Y, Shibuta H. RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. Virology. 1992 Jun;188(2):590-9. doi: 10.1016/0042-6822(92)90513-o. PMID: 1585635.

Helga-Maria, C., Hammarskjöld, M.-L., Rekosh, D., 1999. An Intact TAR Element and Cytoplasmic Localization Are Necessary for Efficient Packaging of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA. J. Virol. 73, 4127–4135. https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4127-4135.1999

Hellmund, C., Lever, A., 2016. Coordination of Genomic RNA Packaging with Viral Assembly in HIV-1. Viruses 8, 192. https://doi.org/10.3390/v8070192

Hemelaar, J., 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic 18, 11.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. AIDS 25, 679–689. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93

Hendrix, J., Baumgärtel, V., Schrimpf, W., Ivanchenko, S., Digman, M.A., Gratton, E., Kräusslich, H.-G., Müller, 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. https://doi.org/10.1083/jcb.201504006

Heng, X., Kharytonchyk, S., Garcia, E.L., Lu, K., Divakaruni, S.S., LaCotti, C., Edme, K., Telesnitsky, A., Summers, M.F., 2012. Identification of a Minimal Region of the HIV-1 5′-Leader Required for RNA Dimerization, NC Binding, and Packaging. J. Mol. Biol. 417, 224–239. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.033

Hill, M., Bellamy-McIntyre, A., Vella, L., Campbell, S., Marshall, J., 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. Curr. HIV Res. 5, 69–78. https://doi.org/10.2174/157016207779316323

Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989. An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2. Nature 339, 389–392. https://doi.org/10.1038/339389a0

Hogue, I.B., Hoppe, A., Ono, A., 2009. Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Gag Interaction: Relative Contributions of the CA and NC Domains and Membrane Binding. J. Virol. 83, 7322–7336. https://doi.org/10.1128/JVI.02545-08

Holmes, M., Zhang, F., Bieniasz, P.D., 2015. Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication. PLOS Pathog. 11, e1004961. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004961

Houzet, L., Morichaud, Z., Didierlaurent, L., Muriaux, D., Darlix, J.-L., Mougel, M., 2008. Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus. Nucleic Acids Res. 36, 2311–2319. https://doi.org/10.1093/nar/gkn069

Houzet, L., Paillart, J.C., Smagulova, F., Maurel, S., Morichaud, Z., Marquet, R., Mougel, M., 2007. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. Nucleic Acids Res. 35, 2695–2704. https://doi.org/10.1093/nar/gkm153

Hu, W.-S., Hughes, S.H., 2012. HIV-1 Reverse Transcription. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006882–a006882. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882

Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A., Freed, E.O., 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. J. Virol. 69, 6810–6818. https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.6810-6818.1995

Hübner, W., Chen, P., Portillo, A.D., Liu, Y., Gordon, R.E., Chen, B.K., 2007. Sequence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Gag Localization and Oligomerization Monitored with Live Confocal Imaging of a Replication-Competent, Fluorescently Tagged HIV-1. J. Virol. 81, 12596–12607. https://doi.org/10.1128/JVI.01088-07

Hue, S., Pillay, D., Clewley, J.P., Pybus, O.G., 2005. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 4425–4429. https://doi.org/10.1073/pnas.0407534102

Hulme, A.E., Kelley, Z., Okocha, E.A., Hope, T.J., 2015. Identification of Capsid Mutations That Alter the Rate of HIV-1 Uncoating in Infected Cells. J. Virol. 89, 643–651. https://doi.org/10.1128/JVI.03043-14

Hurley, J.H., Cada, A.K., 2018. Inside job: how the ESCRTs release HIV-1 from infected cells. Biochem. Soc. Trans. 46, 1029–1036. https://doi.org/10.1042/BST20180019

Ibarrondo FJ, Choi R, Geng YZ, Canon J, Rey O, Baldwin GC, Krogstad P. HIV type 1 Gag and nucleocapsid proteins: cytoskeletal localization and effects on cell motility. AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 Nov 1;17(16):1489-500. doi: 10.1089/08892220152644197. PMID: 11709093.

Inlora, J., Chukkapalli, V., Bedi, S., Ono, A., 2016. Molecular Determinants Directing HIV-1 Gag Assembly to Virus-Containing Compartments in Primary Macrophages. J. Virol. 90, 8509–8519. https://doi.org/10.1128/JVI.01004-16

Isel, C., Lanchy, J.M., Le Grice, S.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Marquet, R., 1996. Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA3Lys. EMBO J. 15, 917–924. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00426.x

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 Pathog. 5, e1000652. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000652

Jalalirad, M., Laughrea, M., 2010. Formation of immature and mature genomic RNA dimers in wild-type and protease-inactive HIV-1: Differential roles of the Gag polyprotein, nucleocapsid proteins NCp15, NCp9, NCp7, and the dimerization initiation site. Virology 407, 225–236. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.013

Jiang, J., Ablan, S.D., Derebail, S., Hercík, K., Soheilian, F., Thomas, J.A., Tang, S., Hewlett, I., Nagashima, K., Gorelick, R.J., Freed, E.O., Levin, J.G., 2011. The interdomain linker region of HIV-1 capsid protein is a critical determinant of proper core assembly and stability. Virology 421, 253–265. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.012

Jolly, C., Mitar, I., Sattentau, Q.J., 2007. Requirement for an Intact T-Cell Actin and Tubulin Cytoskeleton for Efficient Assembly and Spread of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J. Virol. 81, 5547–5560. https://doi.org/10.1128/JVI.01469-06

Jones, C.P., Datta, S.A.K., Rein, A., Rouzina, I., Musier-Forsyth, K., 2011. Matrix Domain Modulates HIV-1 Gag's Nucleic Acid Chaperone Activity via Inositol Phosphate Binding. J. Virol. 85, 1594–1603. https://doi.org/10.1128/JVI.01809-10

Joshi, A., Ablan, S.D., Soheilian, F., Nagashima, K., Freed, E.O., 2009. Evidence that Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly Can Occur in an Intracellular Compartment. J. Virol. 83, 5375–5387. https://doi.org/10.1128/JVI.00109-09

Joshi, A., Garg, H., Nagashima, K., Bonifacino, J.S., Freed, E.O., 2008. GGA and Arf Proteins Modulate Retrovirus Assembly and Release. Mol. Cell 30, 227–238. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.015

Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., Benaroch, P., 2007. HIV-1 Buds and Accumulates in "Nonacidic" Endosomes of Macrophages. Cell Host Microbe 2, 85–95. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.011

Jouvenet, N., Bieniasz, P.D., Simon, S.M., 2008. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. Nature 454, 236–240. https://doi.org/10.1038/nature06998

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, e435. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040435

Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., 2009. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 19114–19119. https://doi.org/10.1073/pnas.0907364106

Jucker, F.M., Heus, H.A., Yip, P.F., Moors, E.H.M., Pardi, A., 1996. A Network of Heterogeneous Hydrogen Bonds in GNRA Tetraloops. J. Mol. Biol. 264, 968–980. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0690

Kafaie, J., Song, R., Abrahamyan, L., Mouland, A.J., Laughrea, M., 2008. Mapping of nucleocapsid residues important for HIV-1 genomic RNA dimerization and packaging. Virology 375, 592–610. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.001

Kaplan, A.H., Zack, J.A., Knigge, M., Paul, D.A., Kempf, D.J., Norbeck, D.W., Swanstrom, R., 1993. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. J. Virol. 67, 4050–4055. https://doi.org/10.1128/JVI.67.7.4050-4055.1993

Karn, J., Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006916–a006916. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916

Karnib, H., Nadeem, M.F., Humbert, N., Sharma, K.K., Grytsyk, N., Tisné, C., Boutant, E., Lequeu, T., Réal, E., Boudier, C., de Rocquigny, H., Mély, Y., 2020. The nucleic acid chaperone activity of the HIV-1 Gag polyprotein is boosted by its cellular partner RPL7: a kinetic study. Nucleic Acids Res. 48, 9218–9234. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa659

Keane, S.C., Heng, X., Lu, K., Kharytonchyk, S., Ramakrishnan, V., Carter, G., Barton, S., Hosic, A., Florwick, A., Santos, J., Bolden, N.C., McCowin, S., Case, D.A., Johnson, B.A., Salemi, M., Telesnitsky, A., Summers, M.F., 2015. Structure of the HIV-1 RNA packaging signal. Science 348, 917–921. https://doi.org/10.1126/science.aaa9266

Keane, S.C., Van, V., Frank, H.M., Sciandra, C.A., McCowin, S., Santos, J., Heng, X., Summers, M.F., 2016. NMR detection of intermolecular interaction sites in the dimeric 5′-leader of the HIV-1 genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 13033–13038. https://doi.org/10.1073/pnas.1614785113

Keele, B.F., 2006. Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. Science 313, 523–526. https://doi.org/10.1126/science.1126531

Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.-H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner, W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 7552–7557. https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105

Kemler, I., Meehan, A., Poeschla, E.M., 2010. Live-Cell Coimaging of the Genomic RNAs and Gag Proteins of Two Lentiviruses. J. Virol. 84, 6352–6366. https://doi.org/10.1128/JVI.00363-10

Kessl, J.J., Kutluay, S.B., Townsend, D., Rebensburg, S., Slaughter, A., Larue, R.C., Shkriabai, N., Bakouche, N., Fuchs, J.R., Bieniasz, P.D., Kvaratskhelia, M., 2016. HIV-1 Integrase Binds the Viral RNA Genome and Is Essential during Virion Morphogenesis. Cell 166, 1257-1268.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.044

Kharytonchyk, S., Brown, J.D., Stilger, K., Yasin, S., Iyer, A.S., Collins, J., Summers, M.F., Telesnitsky, A., 2018. Influence of gag and RRE Sequences on HIV-1 RNA Packaging Signal Structure and Function. J. Mol. Biol. 430, 2066–2079. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.029

Kharytonchyk, S., Monti, S., Smaldino, P.J., Van, V., Bolden, N.C., Brown, J.D., Russo, E., Swanson, C., Shuey, A., Telesnitsky, A., Summers, M.F., 2016. Transcriptional start site heterogeneity modulates the structure and function of the HIV-1 genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 13378–13383. https://doi.org/10.1073/pnas.1616627113

Kim HJ, Lee K, O'Rear JJ. A short sequence upstream of the 5' major splice site is important for encapsidation of HIV-1 genomic RNA. Virology. 1994 Jan;198(1):336-40. doi: 10.1006/viro.1994.1037. PMID: 8259668.

Klingler, J., Anton, H., Réal, E., Zeiger, M., Moog, C., Mély, Y., Boutant, E., 2020. How HIV-1 Gag Manipulates Its Host Cell Proteins: A Focus on Interactors of the Nucleocapsid Domain. Viruses 12, 888. https://doi.org/10.3390/v12080888

Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. AIDS. 1992 Jan;6(1):49-54. doi: 10.1097/00002030-199201000-00006. PMID: 1543566.

Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. Ann Intern Med. 1993 May 1;118(9):681-8. doi: 10.7326/0003-4819-118-9-199305010-00004. PMID: 8096374.

Korber, B., 2000. Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. Science 288, 1789–1796. https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789

Kutluay, S.B., Bieniasz, P.D., 2010. Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. PLoS Pathog. 6, e1001200. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001200

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. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.057

Kuzembayeva, M., Dilley, K., Sardo, L., Hu, W.-S., 2014. Life of psi: How full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. Virology 454–455, 362–370. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.019

Kwa, D., Vingerhoed, J., Boeser, B., Schuitemaker, H., 2003. Increased In Vitro Cytopathicity of CC Chemokine Receptor 5–Restricted Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates Correlates with a Progressive Clinical Course of Infection. J. Infect. Dis. 187, 1397–1403. https://doi.org/10.1086/374650

Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W.A., 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature 393, 648–659. https://doi.org/10.1038/31405

Kyere, S.K., Mercredi, P.Y., Dong, X., Spearman, P., Summers, M.F., 2012. The HIV-1 matrix protein does not interact directly with the protein interactive domain of AP-3δ. Virus Res. 169, 411–414. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.007

Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.-F., SEROCO-HEMOCO Study Group, 2005. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. Clin. Infect. Dis. 41, 1053–1056. https://doi.org/10.1086/433188

Larson, D.R., Ma, Y.M., Vogt, V.M., Webb, W.W., 2003. Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. J. Cell Biol. 162, 1233–1244. https://doi.org/10.1083/jcb.200303200

Laughrea, M., Jetté, L., 1996. Kissing-Loop Model of HIV-1 Genome Dimerization: HIV-1 RNAs Can Assume Alternative Dimeric Forms, and All Sequences Upstream or Downstream of Hairpin 248−271 Are Dispensable for Dimer Formation. Biochemistry 35, 1589–1598. https://doi.org/10.1021/bi951838f

Laughrea, M., Shen, N., Jetté, L., Darlix, J.-L., Kleiman, L., Wainberg, M.A., 2001. Role of Distal Zinc Finger of Nucleocapsid Protein in Genomic RNA Dimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1; No Role for the Palindrome Crowning the R-U5 Hairpin. Virology 281, 109–116. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0778

Laughrea, M., Shen, N., Jetté, L., Wainberg, M.A., 1999. Variant Effects of Non-Native Kissing-Loop Hairpin Palindromes on HIV Replication and HIV RNA Dimerization: Role of Stem−Loop B in HIV Replication and HIV RNA Dimerization †. Biochemistry 38, 226–234. https://doi.org/10.1021/bi981728j

LeGuennec, M., Klena, N., Aeschlimann, G., Hamel, V., Guichard, P., 2021. Overview of the centriole architecture. Curr. Opin. Struct. Biol. 66, 58–65. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.09.015

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. https://doi.org/10.1074/jbc.M808531200

Lehmann-Che J, Saïb A, Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection, AIDS Rev, 2004 Oct-Dec;6(4):199-207, PMID: 15700618

Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., Sodroski, J., 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. J. Virol. 63, 4085–4087. https://doi.org/10.1128/JVI.63.9.4085-4087.1989

Lévesque, K., Halvorsen, M., Abrahamyan, L., Chatel-Chaix, L., Poupon, V., Gordon, H., DesGroseillers, L., Gatignol, A., Mouland, A.J., 2006. Trafficking of HIV-1 RNA is Mediated by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Expression and Impacts on Viral Assembly. Traffic 7, 1177–1193. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00461.x

Levin, J.G., Mitra, M., Mascarenhas, A., Musier-Forsyth, K., 2010. Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. RNA Biol. 7, 754–774. https://doi.org/10.4161/rna.7.6.14115

Li, C., Burdick, R.C., Nagashima, K., Hu, W.-S., Pathak, V.K., 2021. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. 118, e2019467118. https://doi.org/10.1073/pnas.2019467118

Li, H., Dou, J., Ding, L., Spearman, P., 2007. Myristoylation Is Required for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Gag Multimerization in Mammalian Cells. J. Virol. 81, 12899–12910. https://doi.org/10.1128/JVI.01280-07

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. https://doi.org/10.1038/nature03513

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. https://doi.org/10.1128/JVI.75.17.7913-7924.2001

Lindwasser OW, Chaudhuri R, Bonifacino JS, Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses, Curr Mol Med, 2007 Mar;7(2):171-84, doi: 10,2174/156652407780059177, PMID: 17346169,

Lingappa, J.R., Dooher, J.E., Newman, M.A., Kiser, P.K., Klein, K.C., 2006. Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Required for Interaction of HIV-1 Gag with ABCE1 (HP68), a Cellular Protein Important for HIV-1 Capsid Assembly. J. Biol. Chem. 281, 3773–3784. https://doi.org/10.1074/jbc.M507255200

Liu, B., Dai, R., Tian, C.-J., Dawson, L., Gorelick, R., Yu, X.-F., 1999. Interaction of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid with Actin. J. Virol. 73, 2901–2908. https://doi.org/10.1128/JVI.73.4.2901-2908.1999

Liu, R., Wu, J., Shao, R., Xue, Y., 2014. Mechanism and factors that control HIV-1 transcription and latency activation. J. Zhejiang Univ. Sci. B 15, 455–465. https://doi.org/10.1631/jzus.B1400059

Lorizate, M., Krausslich, H.-G., 2011. Role of Lipids in Virus Replication. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a004820–a004820. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004820

Lu, K., Heng, X., Garyu, L., Monti, S., Garcia, E.L., Kharytonchyk, S., Dorjsuren, B., Kulandaivel, G., Jones, S., Hiremath, A., Divakaruni, S.S., LaCotti, C., Barton, S., Tummillo, D., Hosic, A., Edme, K., Albrecht, S., Telesnitsky, A., Summers, M.F., 2011. NMR Detection of Structures in the HIV-1 5'-Leader RNA That Regulate Genome Packaging. Science 334, 242–245. https://doi.org/10.1126/science.1210460

Lu, Kun, Heng, X., Summers, M.F., 2011. Structural Determinants and Mechanism of HIV-1 Genome Packaging. J. Mol. Biol. 410, 609–633. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.029

Luban, J., Goff, S.P., 1994. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. J. Virol. 68, 3784–3793. https://doi.org/10.1128/JVI.68.6.3784-3793.1994

Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., Campbell, E.M., 2014. HIV-1 Uncoating Is Facilitated by Dynein and Kinesin 1. J. Virol. 88, 13613–13625. https://doi.org/10.1128/JVI.02219-14

Lusic, M., Siliciano, R.F., 2017. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. Nat. Rev. Microbiol. 15, 69–82. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.162

Mailler, E., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.-C., Vivet-Boudou, V., Smyth, R., 2016. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag–RNA Complex. Viruses 8, 248. https://doi.org/10.3390/v8090248

Maillot, B., Lévy, N., Eiler, S., Crucifix, C., Granger, F., Richert, L., Didier, P., Godet, J., Pradeau-Aubreton, 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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060734

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. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.076

Malim, M.H., Emerman, M., 2008. HIV-1 Accessory Proteins—Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. Cell Host Microbe 3, 388–398. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.04.008

Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V., Cullen, B.R., 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature 338, 254–257. https://doi.org/10.1038/338254a0

Mamede, J.I., Cianci, G.C., Anderson, M.R., Hope, T.J., 2017. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, E7169–E7178. https://doi.org/10.1073/pnas.1706245114

Mammano, F., Ohagen, A., Höglund, S., Göttlinger, H.G., 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. J. Virol. 68, 4927–4936. https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.4927-4936.1994

Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., Pongor, S., Luzzati, R., Recchia, A., Mavilio, F., Giacca, M., Lusic, M., 2015. Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. Nature 521, 227–231. https://doi.org/10.1038/nature14226

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. https://doi.org/10.1128/JVI.00819-08

Martin-Serrano, J., Neil, S.J.D., 2011. Host factors involved in retroviral budding and release. Nat. Rev. Microbiol. 9, 519–531. https://doi.org/10.1038/nrmicro2596

Mascarenhas, A.P., Musier-Forsyth, K., 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors: Proteomics of HIV-1 capsid. FEBS J. 276, 6118–6127. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07315.x

Mateu, M.G., 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly: Capsid protein interfaces in HIV-1 assembly. FEBS J. 276, 6098–6109. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07313.x

Mattei, S., Tan, A., Glass, B., Müller, B., Kräusslich, H.-G., Briggs, J.A.G., 2018. High-resolution structures of HIV-1 Gag cleavage mutants determine structural switch for virus maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, E9401–E9410. https://doi.org/10.1073/pnas.1811237115

McBride, M.S., Panganiban, A.T., 1997. Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation in vivo. J. Virol. 71, 2050–2058. https://doi.org/10.1128/JVI.71.3.2050-2058.1997

McBride, M.S., Panganiban, A.T., 1996. The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. J. Virol. 70, 2963–2973. https://doi.org/10.1128/jvi.70.5.2963-2973.1996

McBride, M.S., Schwartz, M.D., Panganiban, A.T., 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. J. Virol. 71, 4544–4554. https://doi.org/10.1128/jvi.71.6.4544-4554.1997

Mekdad, H.E., Boutant, E., Karnib, H., Biedma, M.E., Sharma, K.K., Malytska, I., Laumond, G., Roy, M., Réal, E., Paillart, J.-C., Moog, C., Darlix, J.L., Mély, Y., de Rocquigny, H., 2016. Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling. Retrovirology 13, 54. https://doi.org/10.1186/s12977-016-0287-4

Melikyan, G.B., 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. Retrovirology 5, 111. https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-111

Mely, Y., Cornllle, F., Fournié-Zaluski, M.-C., Darlix, J.-L., Roques, B.F., Gérard, D., 1991. Investigation of zinc-binding affinities of moloney murine leukemia virus nucleocapsid protein and its related zinc finger and modified peptides: ZINC-BINDING AFFINITIES OF MoMuLV NCp10. Biopolymers 31, 899–906. https://doi.org/10.1002/bip.360310709

Mély Y, Jullian N, Morellet N, De Rocquigny H, Dong CZ, Piémont E, Roques BP, Gérard D. Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry. 1994 Oct 11;33(40):12085-91. doi: 10.1021/bi00206a011. PMID: 7918429.

Mendonça, L., Sun, D., Ning, J., Liu, J., Kotecha, A., Olek, M., Frosio, T., Fu, X., Himes, B.A., Kleinpeter, A.B., Freed, E.O., Zhou, J., Aiken, C., Zhang, P., 2021. CryoET structures of immature HIV Gag reveal six-helix bundle. Commun. Biol. 4, 481. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01999-1

Mikkelsen JG, Pedersen FS. Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. J Biomed Sci. 2000 Mar-Apr;7(2):77-99. doi: 10.1007/BF02256615. PMID: 10754383.

Milev, M.P., Brown, C.M., Mouland, A.J., 2010. Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. Retrovirology 7, 41. https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-41

Miller, M.D., Farnet, C.M., Bushman, F.D., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. J. Virol. 71, 5382–5390. https://doi.org/10.1128/JVI.71.7.5382-5390.1997

Moir, S., Chun, T.-W., Fauci, A.S., 2011. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 6, 223–248. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130254

Molle, D., Segura-Morales, C., Camus, G., Berlioz-Torrent, C., Kjems, J., Basyuk, E., Bertrand, E., 2009. Endosomal Trafficking of HIV-1 Gag and Genomic RNAs Regulates Viral Egress. J. Biol. Chem. 284, 19727–19743. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019844

Monje-Galvan, V., Voth, G.A., 2020. Binding mechanism of the matrix domain of HIV-1 gag on lipid membranes. eLife 9, e58621. https://doi.org/10.7554/eLife.58621

Moore, M.D., Fu, W., Nikolaitchik, O., Chen, J., Ptak, R.G., Hu, W.-S., 2007. Dimer Initiation Signal of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Its Role in Partner Selection during RNA Copackaging and Its Effects on Recombination. J. Virol. 81, 4002–4011. https://doi.org/10.1128/JVI.02589-06

Moore, M.D., Nikolaitchik, O.A., Chen, J., Hammarskjöld, M.-L., Rekosh, D., Hu, W.-S., 2009. Probing the HIV-1 Genomic RNA Trafficking Pathway and Dimerization by Genetic Recombination and Single Virion Analyses. PLoS Pathog. 5, e1000627. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000627

Morellet, N., Déméné, H., Teilleux, V., Huynh-Dinh, T., de Rocquigny, H., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B.P., 1998. Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). J. Mol. Biol. 283, 419–434. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2098

Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L., Roques, B.P., 1992. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. EMBO J. 11, 3059–3065. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05377.x

Morellet N, Roques BP, Bouaziz S. Structure-function relationship of Vpr: biological implications. Curr HIV Res. 2009 Mar;7(2):184-210. doi: 10.2174/157016209787581490. PMID: 19275588.

Mougel, M., Barklis, E., 1997. A role for two hairpin structures as a core RNA encapsidation signal in murine leukemia virus virions. J. Virol. 71, 8061–8065. https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.8061-8065.1997

Mougel, M., Houzet, L., Darlix, J.-L., 2009. When is it time for reverse transcription to start and go? Retrovirology 6, 24. https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-24

Mouhand, A., Belfetmi, A., Catala, M., Larue, V., Zargarian, L., Brachet, F., Gorelick, R.J., Van Heijenoort, C., Mirambeau, G., Barraud, P., Mauffret, O., Tisné, C., 2018. Modulation of the HIV nucleocapsid dynamics finely tunes its RNA-binding properties during virion genesis. Nucleic Acids Res. 46, 9699–9710. https://doi.org/10.1093/nar/gky612

Mouhand, A., Pasi, M., Catala, M., Zargarian, L., Belfetmi, A., Barraud, P., Mauffret, O., Tisné, C., 2020. Overview of the Nucleic-Acid Binding Properties of the HIV-1 Nucleocapsid Protein in Its Different Maturation States. Viruses 12, 1109. https://doi.org/10.3390/v12101109

Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., Cohen, É.A., 2000. The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufen Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation. J. Virol. 74, 5441–5451. https://doi.org/10.1128/JVI.74.12.5441-5451.2000

Mourez, T., Simon, F., Plantier, J.-C., 2013. Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. Clin. Microbiol. Rev. 26, 448–461. https://doi.org/10.1128/CMR.00012-13

Moyle, G.J., Wildfire, A., Mandalia, S., Mayer, H., Goodrich, J., Whitcomb, J., Gazzard, B.G., 2005. Epidemiology and Predictive Factors for Chemokine Receptor Use in HIV-1 Infection. J. Infect. Dis. 191, 866–872. https://doi.org/10.1086/428096

Mujeeb A, Clever JL, Billeci TM, James TL, Parslow TG. Structure of the dimer initiation complex of HIV-1 genomic RNA. Nat Struct Biol. 1998 Jun;5(6):432-6. doi: 10.1038/nsb0698-432. PMID: 9628479.

Müller, B., Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., Zentgraf, H., Kräusslich, H.-G., 2004. Construction and Characterization of a Fluorescently Labeled Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derivative. J. Virol. 78, 10803–10813. https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10803-10813.2004

Munro, J.B., Nath, A., Färber, M., Datta, S.A.K., Rein, A., Rhoades, E., Mothes, W., 2014. A Conformational Transition Observed in Single HIV-1 Gag Molecules during *In Vitro* Assembly of Virus-Like Particles. J. Virol. 88, 3577–3585. https://doi.org/10.1128/JVI.03353-13

Murakami, T., Freed, E.O., 2000. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 343–348. https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.343

Muriaux, D., Darlix, J.-L., 2010. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. RNA Biol. 7, 744–753. https://doi.org/10.4161/rna.7.6.14065

Muriaux, D., Fossé, P., Paoletti, J., 1996. A Kissing Complex Together with a Stable Dimer Is Involved in the HIV-1 $_{Lai}$ RNA Dimerization Process *in Vitro* †. Biochemistry 35, 5075–5082. https://doi.org/10.1021/bi952822s

Muriaux, D., Girard, P.-M., Bonnet-Mathonière, B., Paoletti, J., 1995. Dimerization of HIV-1Lai RNA at Low Ionic Strength. J. Biol. Chem. 270, 8209–8216. https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8209

Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., Rein, A., 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 5246–5251. https://doi.org/10.1073/pnas.091000398

Murphy, R.E., Saad, J.S., 2020. The Interplay between HIV-1 Gag Binding to the Plasma Membrane and Env Incorporation. Viruses 12, 548. https://doi.org/10.3390/v12050548

Murphy, R.E., Samal, A.B., Vlach, J., Saad, J.S., 2017. Solution Structure and Membrane Interaction of the Cytoplasmic Tail of HIV-1 gp41 Protein. Structure 25, 1708-1718.e5. https://doi.org/10.1016/j.str.2017.09.010

Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I., Rosbash, M., 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. Curr. Biol. 7, 767–775. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00335-6

Nguyen, D.G., Booth, A., Gould, S.J., Hildreth, J.E.K., 2003. Evidence That HIV Budding in Primary Macrophages Occurs through the Exosome Release Pathway. J. Biol. Chem. 278, 52347–52354. https://doi.org/10.1074/jbc.M309009200

Nikolaitchik, O., Rhodes, T.D., Ott, D., Hu, W.-S., 2006. Effects of Mutations in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene on RNA Packaging and Recombination. J. Virol. 80, 4691–4697. https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4691-4697.2006

Nikolaitchik, O.A., Dilley, K.A., Fu, W., Gorelick, R.J., Tai, S.-H.S., Soheilian, F., Ptak, R.G., Nagashima, K., Pathak, V.K., Hu, W.-S., 2013. Dimeric RNA Recognition Regulates HIV-1 Genome Packaging. PLoS Pathog. 9, e1003249. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003249

Nkwe, D.O., Pelchen-Matthews, A., Burden, J.J., Collinson, L.M., Marsh, M., 2016. The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages. BMC Biol. 14, 50. https://doi.org/10.1186/s12915-016-0272-3

Novikova, M., Zhang, Y., Freed, E.O., Peng, K., 2019. Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. Virol. Sin. 34, 119–134. https://doi.org/10.1007/s12250-019-00095-3

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. https://doi.org/10.1046/j.1600-0854.2003.00145.x

Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartzt, O., Heardt, J.-M., Clark-Lewist, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B., 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by I-cell-line-adapted HIV- 382, 3.

Ohishi, M., Nakano, T., Sakuragi, S., Shioda, T., Sano, K., Sakuragi, J. -i., 2011. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. Nucleic Acids Res. 39, 3404–3417. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1314

Olivo-Marin, J.-C., 2002. Extraction of spots in biological images using multiscale products. Pattern Recognit. 35, 1989–1996. https://doi.org/10.1016/S0031-3203(01)00127-3

Onafuwa, A., An, W., Robson, N.D., Telesnitsky, A., 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Recombination Is More Frequent Than That of Moloney Murine Leukemia Virus despite Similar Template Switching Rates. J. Virol. 77, 4577–4587. https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4577-4587.2003

Onafuwa-Nuga, A.A., 2006. 7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. RNA 12, 542–546. https://doi.org/10.1261/rna.2306306

Ono, A., Ablan, S.D., Lockett, S.J., Nagashima, K., Freed, E.O., 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 14889–14894. https://doi.org/10.1073/pnas.0405596101

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. https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1552-1563.2004

Ono, A., Freed, E.O., 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 13925–13930. https://doi.org/10.1073/pnas.241320298

Orenstein, J.M., Meltzer, M.S., Phipps, T., Gendelman, H.E., 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. J. Virol. 62, 2578–2586. https://doi.org/10.1128/jvi.62.8.2578-2586.1988

Ott, D.E., Coren, L.V., Shatzer, T., 2009. The Nucleocapsid Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Assists in the Coordination of Assembly and Gag Processing: Role for RNA-Gag Binding in the Early Stages of Assembly. J. Virol. 83, 7718–7727. https://doi.org/10.1128/JVI.00099-09

Paillart, J C, Berthoux, L., Ottmann, M., Darlix, J.L., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1996. A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. J. Virol. 70, 8348–8354. https://doi.org/10.1128/jvi.70.12.8348-8354.1996

Paillart, J.C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. J. Biol. Chem. 269, 27486–27493. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47011-1

Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., Mak, J., 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. Nat. Rev. Microbiol. 2, 461–472. https://doi.org/10.1038/nrmicro903

Paillart, J. C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Marquet, R., 1996. A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 5572–5577. https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5572

Paillart, J.-C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Marquet, R., 1997. Non-canonical interactions in a kissing loop complex: the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. J. Mol. Biol. 270, 36–49. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1096

Parent, L.J., Gudleski, N., 2011. Beyond Plasma Membrane Targeting: Role of the MA domain of Gag in Retroviral Genome Encapsidation. J. Mol. Biol. 410, 553–564. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.072

Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., Marsh, M., 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. J. Cell Biol. 162, 443–455. https://doi.org/10.1083/jcb.200304008

Penn, M.L., Grivel, J.-C., Schramm, B., Goldsmith, M.A., Margolis, L., 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 663–668. https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.663

Perilla, J.R., Gronenborn, A.M., 2016. Molecular Architecture of the Retroviral Capsid. Trends Biochem. Sci. 41, 410–420. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.009

Perlman, M., Resh, M.D., 2006. Identification of an Intracellular Trafficking and Assembly Pathway for HIV-1 Gag: HIV-1 Gag Trafficking Pathway. Traffic 7, 731–745. https://doi.org/10.1111/j.1398-9219.2006.00428.x

Peterlin, B.M., Trono, D., 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. Nat. Rev. Immunol. 3, 97–107. https://doi.org/10.1038/nri998

Pettit, S.C., Moody, M.D., Wehbie, R.S., Kaplan, A.H., Nantermet, P.V., Klein, C.A., Swanstrom, R., 1994. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. J. Virol. 68, 8017–8027. https://doi.org/10.1128/JVI.68.12.8017-8027.1994

Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat. Med. 15, 871–872. https://doi.org/10.1038/nm.2016

Poole, E., Strappe, P., Mok, H.-P., Hicks, R., Lever, A.M.L., 2005. HIV-1 Gag-RNA Interaction Occurs at a Perinuclear/Centrosomal Site; Analysis by Confocal Microscopy and FRET: HIV-1 Gag-RNA Interaction Occurs in a Perinuclear Region. Traffic 6, 741–755. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00312.x

Poon, D.T., Wu, J., Aldovini, A., 1996. Charged amino acid residues of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p7 protein involved in RNA packaging and infectivity. J. Virol. 70, 6607–6616. https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.6607-6616.1996

Poon, D.T.K., Chertova, E.N., Ott, D.E., 2002. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preferentially Encapsidates Genomic RNAs That Encode Pr55Gag: Functional Linkage between Translation and RNA Packaging. Virology 293, 368–378. https://doi.org/10.1006/viro.2001.1283

Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Göttlinger, H.G., 2009. Divergent Bro1 Domains Share the Capacity To Bind Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid and To Enhance Virus-Like Particle Production. J. Virol. 83, 7185–7193. https://doi.org/10.1128/JVI.00198-09

Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Göttlinger, H.G., 2008. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Engages the Bro1 Domain of ALIX/AIP1 through the Nucleocapsid. J. Virol. 82, 1389–1398. https://doi.org/10.1128/JVI.01912-07

Popova, E., Popov, S., Göttlinger, H.G., 2010. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid p1 Confers ESCRT Pathway Dependence. J. Virol. 84, 6590–6597. https://doi.org/10.1128/JVI.00035-10

Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., 2011. Atomic-level modelling of the HIV capsid. Nature 469, 424–427. https://doi.org/10.1038/nature09640

Prats, A.C., Sarih, L., Gabus, C., Litvak, S., Keith, G., Darlix, J.L., 1988. Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. EMBO J. 7, 1777–1783. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03008.x

Purcell, D.F., Martin, M.A., 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. J. Virol. 67, 6365–6378. https://doi.org/10.1128/jvi.67.11.6365-6378.1993

Querido, E., Chartrand, P., 2008. Using Fluorescent Proteins to Study mRNA Trafficking in Living Cells, in: Methods in Cell Biology. Elsevier, pp. 273–292. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85012-1

Rahman, S.A., Koch, P., Weichsel, J., Godinez, W.J., Schwarz, U., Rohr, K., Lamb, D.C., Kräusslich, H.-G., Müller, B., 2014. Investigating the Role of F-Actin in Human Immunodeficiency Virus Assembly by Live-Cell Microscopy. J. Virol. 88, 7904–7914. https://doi.org/10.1128/JVI.00431-14

Ramirez, B.C., Simon-Loriere, E., Galetto, R., Negroni, M., 2008. Implications of recombination for HIV diversity. Virus Res. 134, 64–73. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.01.007

Rao, S., Hassine, S., Monette, A., Amorim, R., DesGroseillers, L., Mouland, A.J., 2019. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. RNA 25, 727–736. https://doi.org/10.1261/rna.069351.118

Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., Geuze, H., 2002. Human Macrophages Accumulate HIV-1 Particles in MHC II Compartments: HIV-1 Accumulates in MIIC. Traffic 3, 718–729. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31004.x

Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Encinas, S., Souyris, C., Bruel, P., Sandres-Sauné, K., Marchou, B., Massip, P., Izopet, J., 2010. CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. AIDS 24, 2305–2312. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833e50bb

Raymond, S., Piffaut, M., Bigot, J., Cazabat, M., Montes, B., Bertrand, K., Martin-Blondel, G., Izopet, J., Delobel, P., 2020. Sexual transmission of an extensively drug-resistant HIV-1 strain. Lancet HIV 7, e529–e530. https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30205-8

Raymond, S., Saliou, A., Nicot, F., Delobel, P., Dubois, M., Carcenac, R., Saune, K., Marchou, B., Massip, P., Izopet, J., 2013. Characterization of CXCR4-using HIV-1 during primary infection by ultra-deep pyrosequencing. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2875–2881. https://doi.org/10.1093/jac/dkt290

Reed, J.C., Molter, B., Geary, C.D., McNevin, J., McElrath, J., Giri, S., Klein, K.C., Lingappa, J.R., 2012. HIV-1 Gag co-opts a cellular complex containing DDX6, a helicase that facilitates capsid assembly. J. Cell Biol. 198, 439–456. https://doi.org/10.1083/jcb.201111012

Reeves, J.D., Doms, R.W., 2002. Human immunodeficiency virus type 2. J. Gen. Virol. 13. https://doi.org/10.1099/vir.0.18253-0

Rein, A., 2019. RNA Packaging in HIV. Trends Microbiol. 27, 715–723. https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.003

Rein, A., 2010. Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. RNA Biol. 7, 700–705. https://doi.org/10.4161/rna.7.6.13685

Rein, A., Datta, S.A.K., Jones, C.P., Musier-Forsyth, K., 2011. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. Trends Biochem. Sci. S0968000411000545. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.04.001

Rein A. Retroviral RNA packaging: a review. Arch Virol Suppl. 1994;9:513-22. doi: 10.1007/978-3-7091-9326-6_49. PMID: 8032280.

Repits, J., Öberg, M., Esbjörnsson, J., Medstrand, P., Karlsson, A., Albert, J., Fenyö, E.M., Jansson, M., 2005. Selection of human immunodeficiency virus type 1 R5 variants with augmented replicative capacity and reduced sensitivity to entry inhibitors during severe immunodeficiency. J. Gen. Virol. 86, 2859–2869. https://doi.org/10.1099/vir.0.81111-0

Repits, J., Sterjovski, J., Badia-Martinez, D., Mild, M., Gray, L., Churchill, M.J., Purcell, D.F.J., Karlsson, A., Albert, J., Fenyö, E.M., Achour, A., Gorry, P.R., Jansson, M., 2008. Primary HIV-1 R5 isolates from end-stage disease display enhanced viral fitness in parallel with increased gp120 net charge. Virology 379, 125–134. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.014

Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premsri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P., Stablein, D., Birx, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kunasol, P., Kim, J.H., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. N. Engl. J. Med. 361, 2209–2220. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908492

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. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.002

Rey, O., Canon, J., Krogstad, P., 1996. HIV-1 Gag Protein Associates with F-actin Present in Microfilaments. Virology 220, 530–534. https://doi.org/10.1006/viro.1996.0343

Rhodes, T., Wargo, H., Hu, W.-S., 2003. High Rates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombination: Near-Random Segregation of Markers One Kilobase Apart in One Round of Viral Replication. J. Virol. 77, 11193–11200. https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11193-11200.2003

Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. J Infect Dis. 1994 May;169(5):968-74. doi: 10.1093/infdis/169.5.968. PMID: 7909549.

Rizzuto, C.D., 1998. A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. Science 280, 1949–1953. https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1949

Roberts, J., Bebenek, K., Kunkel, T., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science 242, 1171–1173. https://doi.org/10.1126/science.2460925

Robinson, B.A., Reed, J.C., Geary, C.D., Swain, J.V., Lingappa, J.R., 2014. A Temporospatial Map That Defines Specific Steps at Which Critical Surfaces in the Gag MA and CA Domains Act during Immature HIV-1 Capsid Assembly in Cells. J. Virol. 88, 5718–5741. https://doi.org/10.1128/JVI.03609-13

Rose, K.M., Hirsch, V.M., Bouamr, F., 2020. Budding of a Retrovirus: Some Assemblies Required. Viruses 12, 1188. https://doi.org/10.3390/v12101188

Rosé, S., Hensley, P., O'Shannessy, D.J., Culp, J., Debouck, C., Chaiken, I., 1992. Characterization of HIV-1 p24 self-association using analytical affinity chromatography. Proteins Struct. Funct. Genet. 13, 112–119. https://doi.org/10.1002/prot.340130204

Rosen, C.A., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. Cell 41, 813–823. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80062-3

Rowell, J.F., Stanhope, P.E., Siliciano, R.F., 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. J. Immunol. 17.

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. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.011

Rulli, S.J., 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. https://doi.org/10.1128/JVI.02833-06

Russell, R.S., Hu, J., Beriault, V., Mouland, A.J., Kleiman, L., Wainberg, M.A., Liang, C., 2003. Sequences Downstream of the 5J Splice Donor Site Are Required for both Packaging and Dimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. J VIROL 77, 13.

Russell, R.S., Liang, C., Wainberg, M.A., 2004. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? Retrovirology 1, 23. https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-23

Saad, J.S., Ablan, S.D., Ghanam, R.H., Kim, A., Andrews, K., Nagashima, K., Soheilian, F., Freed, E.O., Summers, M.F., 2008. Structure of the Myristylated Human Immunodeficiency Virus Type 2 Matrix Protein and the Role of Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate in Membrane Targeting. J. Mol. Biol. 382, 434–447. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.027

Saad, J.S., Loeliger, E., Luncsford, P., Liriano, M., 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. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.068

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. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 11364–11369. https://doi.org/10.1073/pnas.0602818103

Sakaguchi, K., Zambrano, N., BALDWINt, E.T., Shapiroi, B.A., ERICKSONt, J.W., Omichinski, J.G., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., 1993. Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 5.

Sakuragi, J., Shioda, T., Panganiban, A.T., 2001. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in Virions. J. Virol. 75, 2557–2565. https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2557-2565.2001

Salter, J.D., Morales, G.A., Smith, H.C., 2014. Structural insights for HIV-1 therapeutic strategies targeting Vif. Trends Biochem. Sci. 39, 373–380. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.001

Sardo, L., Hatch, S.C., Chen, J., Nikolaitchik, O., Burdick, R.C., Chen, D., Westlake, C.J., Lockett, S., Pathak, V.K., Hu, W.-S., 2015. Dynamics of HIV-1 RNA Near the Plasma Membrane during Virus Assembly. J. Virol. 89, 10832–10840. https://doi.org/10.1128/JVI.01146-15

Sarni, S., Biswas, B., Liu, S., Olson, E.D., Kitzrow, J.P., Rein, A., Wysocki, V.H., Musier-Forsyth, K., 2020. HIV-1 Gag protein with or without p6 specifically dimerizes on the viral RNA packaging signal. J. Biol. Chem. 295, 14391–14401. https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014835

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. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.088

Schwartz, M.D., Fiore, D., Panganiban, A.T., 1997. Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. J. Virol. 71, 9295–9305. https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9295-9305.1997

Scoggins, R.M., Taylor, J.R., Patrie, J., van't Wout, A.B., Schuitemaker, H., Camerini, D., 2000. Pathogenesis of Primary R5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clones in SCID-hu Mice. J. Virol. 74, 3205–3216. https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3205-3216.2000

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. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108201

Sette, P., Dussupt, V., Bouamr, F., 2012. Identification of the HIV-1 NC Binding Interface in Alix Bro1 Reveals a Role for RNA. J. Virol. 86, 11608–11615. https://doi.org/10.1128/JVI.01260-12

Shaw, G.M., Hunter, E., 2012. HIV Transmission. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006965–a006965. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965

Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., Mothes, W., 2003. Visualization of Retroviral Replication in Living Cells Reveals Budding into Multivesicular Bodies: Retroviral Budding. Traffic 4, 785–801. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00135.x

Sherer, N.M., Swanson, C.M., Papaioannou, S., Malim, M.H., 2009. Matrix Mediates the Functional Link between Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Nuclear Export Elements and the Assembly Competency of Gag in Murine Cells. J. Virol. 83, 8525–8535. https://doi.org/10.1128/JVI.00699-09

Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T.J., Qi, Y., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Jin, Y., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., 2011. A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms. PLoS Biol. 9, e1001041. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001041

Simon, François, Philippe Mauclère, Pierre Roques, Ibtissam Loussert-Ajaka, Michaela C. Müller-Trutwin, Sentob Saragosti, Marie Claude Georges-Courbot, Françoise Barré-Sinoussi, and F.B.-V., 1998. Identification of a New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Distinct from Group M and Group O. Nat. Med. 4. https://doi.org/10.1038/2017

Singer-Krüger, B., Frank, R., Crausaz, F., Riezman, H., 1993. Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. J. Biol. Chem. 268, 14376–14386. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85250-X

Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1996. Psoralen Crosslinking between Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA and Primer tRNA3Lys. Nucleic Acids Res. 24, 509–514. https://doi.org/10.1093/nar/24.3.509

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. 91, 4945–4949. https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4945

Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. Virus Res. 169, 415–429. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.015

Song, R., Kafaie, J., Laughrea, M., 2008. Role of the 5′ TAR Stem−Loop and the U5-AUG Duplex in Dimerization of HIV-1 Genomic RNA. Biochemistry 47, 3283–3293. https://doi.org/10.1021/bi7023173

Souslova, E.A., Mironova, K.E., Deyev, S.M., 2017. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOG: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing. J. Biophotonics 10, 338–352. https://doi.org/10.1002/jbio.201600120

South, T.L., Bo, K., Hare, D.R., Summers, M.F., 1990. Zinc fingers and molecular recognition. Structure and nucleic acid binding studies of an HIV zinc finger-like domain. Biochem. Pharmacol. 40, 123–129. https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90187-P

South, T.L., Summers, M.F., 1993. Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC: HIV-I NC zinc finger complex. Protein Sci. 2, 3–19. https://doi.org/10.1002/pro.5560020102

Spijkerman IJ, Koot M, Prins M, Keet IP, van den Hoek AJ, Miedema F, Coutinho RA. Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among injecting drug users compared with homosexual men. AIDS. 1995 Sep;9(9):1085-92. doi: 10.1097/00002030-199509000-00016. PMID: 8527083.

Spriggs, S., Garyu, L., Connor, R., Summers, M.F., 2008. Potential Intra- and Intermolecular Interactions Involving the Unique-5′ Region of the HIV-1 5′-UTR. Biochemistry 47, 13064–13073. https://doi.org/10.1021/bi8014373

Stake, M., Bann, D., Kaddis, R., Parent, L., 2013. Nuclear Trafficking of Retroviral RNAs and Gag Proteins during Late Steps of Replication. Viruses 5, 2767–2795. https://doi.org/10.3390/v5112767

Stevens, M., De Clercq, E., Balzarini, J., 2006. The regulation of HIV-1 transcription: Molecular targets for chemotherapeutic intervention. Med. Res. Rev. 26, 595–625. https://doi.org/10.1002/med.20081

Stevenson M, HIV-1 pathogenesis, Nat Med, 2003 Jul;9(7):853-60, doi: 10,1038/nm0703-853, PMID: 12835705.

Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., South, T.L., Blake, P.R., Perez-Alvarado, G., Bess, J.W., Sowder, R.C., Arthur, L.O., Sagi, I., Hare, D.R., 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 Sci. 1, 563–574. https://doi.org/10.1002/pro.5560010502

Sundquist, W.I., Krausslich, H.-G., 2012. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006924–a006924. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924

Suzuki, Y., Craigie, R., 2007. The road to chromatin — nuclear entry of retroviruses. Nat. Rev. Microbiol. 5, 187–196. https://doi.org/10.1038/nrmicro1579

Swanson, C.M., Malim, M.H., 2006. Retrovirus RNA Trafficking: From Chromatin to Invasive Genomes. Traffic 7, 1440–1450. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00488.x

Swanson, C.M., Puffer, B.A., Ahmad, K.M., Doms, R.W., Malim, M.H., 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. EMBO J. 23, 2632–2640. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600270

Tanchou, V., Decimo, D., Péchoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M., Darlix, J.-L., 1998. Role of the N-Terminal Zinc Finger of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein in Virus Structure and Replication. J. Virol. 72, 4442–4447. https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.4442-4447.1998

Tanwar, H.S., Khoo, K.K., Garvey, M., Waddington, L., Leis, A., Hijnen, M., Velkov, T., Dumsday, G.J., McKinstry, W.J., Mak, J., 2017. The thermodynamics of Pr55Gag-RNA interaction regulate the assembly of HIV. PLOS Pathog. 13, e1006221. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006221

Tedbury, P.R., Freed, E.O., 2015. The Cytoplasmic Tail of Retroviral Envelope Glycoproteins, in: Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, pp. 253–284. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.10.009

Tedbury, P.R., Freed, E.O., 2014. The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. Trends Microbiol. 22, 372–378. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.012

Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, Miedema F. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. Lancet. 1989 May 6;1(8645):983-5. doi: 10.1016/s0140-6736(89)92628-7. PMID: 2565516.

Thornhill, D., Murakami, T., Ono, A., 2020. Rendezvous at Plasma Membrane: Cellular Lipids and tRNA Set up Sites of HIV-1 Particle Assembly and Incorporation of Host Transmembrane Proteins. Viruses 12, 842. https://doi.org/10.3390/v12080842

Todd, G.C., Duchon, A., Inlora, J., Olson, E.D., Musier-Forsyth, K., Ono, A., 2017. Inhibition of HIV-1 Gag–membrane interactions by specific RNAs. RNA 23, 395–405. https://doi.org/10.1261/rna.058453.116

Tokarev, A., Guatelli, J., 2011. Misdirection of membrane trafficking by HIV-1 Vpu and Nef: keys to viral virulence and persistence. Cell. Logist. 1, 90–102. https://doi.org/10.4161/cl.1.3.16708

Tuffy, K.M., Maldonado, R.J.K., Chang, J., Rosenfeld, P., Cochrane, A., Parent, L.J., 2020. HIV-1 Gag Forms Ribonucleoprotein Complexes with Unspliced Viral RNA at Transcription Sites. Viruses 12, 1281. https://doi.org/10.3390/v12111281

Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., G. Göttlinger, H., 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. Biochem. Soc. Trans. 37, 181–184. https://doi.org/10.1042/BST0370181

Usami, Y., Wu, Y., Göttlinger, H.G., 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. Nature 526, 218–223. https://doi.org/10.1038/nature15400

van Bel, N., van der Velden, Y., Bonnard, D., Le Rouzic, E., Das, A.T., Benarous, R., Berkhout, B., 2014. The Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitor BI-D Affects Virion Maturation but Does Not Influence Packaging of a Functional RNA Genome. PLoS ONE 9, e103552. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103552

van't Wout, A.B., Kootstra, N.A., Mulder-Kampinga, G.A., Albrecht-van Lent, N., Scherpbier, H.J., Veenstra, J., Boer, K., Coutinho, R.A., Miedema, F., Schuitemaker, H., 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. J. Clin. Invest. 94, 2060–2067. https://doi.org/10.1172/JCI117560

Verli, H., Calazans, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., Guimarães, J.A., 2007. Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures. J. Mol. Graph. Model. 26, 62–68. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.09.009

Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., Charpentier, C., 2016. Hiv-2 molecular epidemiology. Infect. Genet. Evol. 46, 233–240. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.010

Vlach, J., Saad, J.S., 2013. Trio engagement via plasma membrane phospholipids and the myristoyl moiety governs HIV-1 matrix binding to bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 3525–3530. https://doi.org/10.1073/pnas.1216655110

von Appen, A., Beck, M., 2016. Structure Determination of the Nuclear Pore Complex with Three-Dimensional Cryo electron Microscopy. J. Mol. Biol. 428, 2001–2010. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.004

von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Garrus, J.E., Sundquist, W.I., 2003. Functional Surfaces of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein. J. Virol. 77, 5439–5450. https://doi.org/10.1128/JVI.77.9.5439-5450.2003

Wagner, J.M., Zadrozny, K.K., Chrustowicz, J., Purdy, M.D., Yeager, M., Ganser-Pornillos, B.K., Pornillos, O., 2016. Crystal structure of an HIV assembly and maturation switch. eLife 5, e17063. https://doi.org/10.7554/eLife.17063

Wang, S.-W., Aldovini, A., 2002. RNA Incorporation Is Critical for Retroviral Particle Integrity after Cell Membrane Assembly of Gag Complexes. J. Virol. 76, 11853–11865. https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.11853-11865.2002

Wang, W., Naiyer, N., Mitra, M., Li, J., Williams, M.C., Rouzina, I., Gorelick, R.J., Wu, Z., Musier-Forsyth, K., 2014. Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein precursor NCp15 explain reduced viral infectivity. Nucleic Acids Res. 42, 7145–7159. https://doi.org/10.1093/nar/gku335

Warren, K., Wei, T., Li, D., Qin, F., Warrilow, D., Lin, M.-H., Sivakumaran, H., Apolloni, A., Abbott, C.M., Jones, A., Anderson, J.L., Harrich, D., 2012. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 9587–9592. https://doi.org/10.1073/pnas.1204673109

Warrilow, D., Tachedjian, G., Harrich, D., 2009. Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. Rev. Med. Virol. 19, 324–337. https://doi.org/10.1002/rmv.627

Webb, J.A., Jones, C.P., Parent, L.J., Rouzina, I., Musier-Forsyth, K., 2013. Distinct binding interactions of HIV-1 Gag to Psi and non-Psi RNAs: Implications for viral genomic RNA packaging. RNA 19, 1078–1088. https://doi.org/10.1261/rna.038869.113

Weixlbaumer, A., 2004. Determination of thermodynamic parameters for HIV DIS type loop-loop kissing complexes. Nucleic Acids Res. 32, 5126–5133. https://doi.org/10.1093/nar/gkh841

Welsch, S., Keppler, O.T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., Kräusslich, H.-G., 2007. HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages. PLoS Pathog. 3, e36. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030036

Wilen, C.B., Tilton, J.C., Doms, R.W., 2012. HIV: Cell Binding and Entry. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006866–a006866. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866

Wilkinson, K.A., Gorelick, R.J., Vasa, S.M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D.H., Giddings, M.C., Weeks, K.M., 2008. High-Throughput SHAPE Analysis Reveals Structures in HIV-1 Genomic RNA Strongly Conserved across Distinct Biological States. PLoS Biol. 6, e96. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060096

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., Sodroski, J., 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. Nature 384, 179–183. https://doi.org/10.1038/384179a0

Xing, L., Liang, C., Kleiman, L., 2011. Coordinate Roles of Gag and RNA Helicase A in Promoting the Annealing of Formula to HIV-1 RNA. J. Virol. 85, 1847–1860. https://doi.org/10.1128/JVI.02010-10

Yamashita, M., Emerman, M., 2005. Retroviral infection of non-dividing cells: Old and new perspectives. Virology 344, 88–93. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.012

Zhang, Y., Barklis, E., 1997. Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. J. Virol. 71, 6765–6776. https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6765-6776.1997

Zhang, Z., Kang, S.-M., Li, Y., Morrow, C.D., 1998. Genetic analysis of the U5-PBS of a novel HIV-1 reveals multiple interactions between the tRNA and RNA genome required for initiation of reverse transcription RNA, 13.

Zhao, R.Y., Bukrinsky, M.I., 2014. HIV-1 Accessory Proteins: VpR, in: Vicenzi, E., Poli, G. (Eds.), Human Retroviruses, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 125–134. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_11

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., 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. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 15812–15817. https://doi.org/10.1073/pnas.2634931100

Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D., Cao, Y., Koup, R., Ho, D., 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. Science 261, 1179–1181. https://doi.org/10.1126/science.8356453

Zhuang, S., Torbett, B.E., 2021. Interactions of HIV-1 Capsid with Host Factors and Their Implications for Developing Novel Therapeutics. Viruses 13, 417. https://doi.org/10.3390/v13030417

Zila, V., Margiotta, E., Turoňová, B., Müller, T.G., Zimmerli, C.E., Mattei, S., Allegretti, M., Börner, K., Rada, J., Müller, B., Lusic, M., Kräusslich, H.-G., Beck, M., 2021. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. Cell 184, 1032-1046.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.025

ANNEXES

Annexe 1

Formation of HIV-1 nucleoprotein complexes between Gag and the genomic RNA by a quantitative analysis using transmission electron microscopy

Running title: HIV-1 Gag-gRNA clusters analysis by electron microscopy

[1]Stéphanie Durand, [1]Florian Seigneuret, [2]Julien Burlaud-Gaillard, [3]Roxane Lemoine, [1]Alain Moreau, [5]Marylène Mougel, [1,2]Philippe Roingeard, [4]Clovis Tauber, and [1]Hugues de Rocquigny*

Manuscrit en révision dans *Journal of Biochemical Chemistry*

Formation of HIV-1 nucleoprotein complexes between Gag and the genomic RNA by a quantitative analysis using transmission electron microscopy

Authors: [1]Stéphanie Durand, [1]Florian Seigneuret, [2]Julien Burlaud-Gaillard, [3]Roxane Lemoine, [1]Alain Moreau, [5]Marylène Mougel, [1,2]Philippe Roingeard, [4]Clovis Tauber, and [1]Hugues de Rocquigny*

[1] Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites, Inserm – U1259 MAVIVH, Hôpital Bretonneau, 10 boulevard Tonnellé - BP 3223 37032 Tours Cedex 1 – France.

[2] Plateforme IBiSA des Microscopies, PPF ASB, Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé - BP 3223 37032 Tours Cedex 1 – France.

[3] Plateforme B Cell Ressources, EA4245 "Transplantation, Immunologie et Inflammation", Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1 – France.

[4] UMR U1253 iBrain, Inserm, Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1 – France.

[5] Équipe R2D2 Retroviral RNA Dynamics and Delivery, IRIM, CNRS UMR9004, University of Montpellier, Montpellier, France.

*** Corresponding author:**

Hugues de Rocquigny

Tel: 33 (2) 47 36 60 93 Fax : 33 (2) 47 36 61 26

e-mail: hderocquigny@univ-tours.fr

Abstract

The present view of HIV-1 assembly stipulates that newly made Gag precursor molecules kick-start virus assembly upon binding to the viral genomic RNA (gRNA), causing the formation of low-order oligomeric ribonucleoprotein complexes. The intracellular localization of these complexes was studied by electron microscopy, and distances between the two partners were

monitored by a morphometric analysis of gold beads specifically labeling Gag and gRNA. Formation of these viral clusters occurred soon after the nuclear export of the gRNA. During their transport to the plasma membrane, the distance between Gag and gRNA decreases together with an increase of gRNA packaging. Point mutations in the GagNC zinc fingers caused an increase in the distance between Gag and the gRNA together with a large decrease of the packaged gRNA into virions. Deletion of the gRNA-SL1 does not interfere with gRNA packaging while deletion of SL3 is sufficient to decrease but not abolish Gag-gRNA cluster formation and gRNA packaging. In conclusion, this morphometric analysis of Gag/gRNA cluster formation sheds new light on HIV-1 assembly.

Keywords

HIV-1, Assembly, Gag, genomic RNA, Transmission Electron Microscopy, Morphometric TEM analysis

Abbreviations

Cy: Cytoplasm; gRNA: Genomic RNA; Nu: Nucleus; PM: Plasma Membrane; PT: Post-Transfection; SEM: Standard Error of the Mean; TEM: Transmission Electron Microscopy

Introduction

Production of HIV-1 particles by infected cells is a complex process that is coordinated by the Gag and GagPol polyprotein precursors. Gag assembly begins with binding to genomic RNA (gRNA) resulting in gRNA dimerization and the formation of Gag oligomers. During virus assembly Gag is processed by the viral protease (PR) generating the MAp17, CAp24, NCp7 and p6 structural proteins found in infectious mature viral particles soon after budding[1]. The current model for HIV-1 assembly stipulates that Gag oligomerization results from CA-CA interactions along with Gag binding to the gRNA mediated by the NC domain (referred to as GagNC), causing the formation of Gag-gRNA ribonucleoprotein complexes[2].This oligomerization process also induces a structural modification of MA, exposing its N-terminal myristate that, together with the MA highly basic region (HBR), target the Gag–gRNA oligomers to the plasma membrane (PM) enriched in PI(4,5)P2 lipids[3]. This model is supported by biochemical findings showing that the binding of low-order Gag oligomers to the gRNA occurs in the cytoplasm and then traffic to the plasma membrane where thousands of Gag molecules are added to complete assembly resulting in the formation of immature virions[4]. Cytoplasmic localization of Gag-gRNA nucleoprotein complexes and their traffic to the PM was also confirmed by the co-localization of the two partners as observed by optical microscopy[5–10] and by monitoring their interaction using quantitative fluorescent microscopies[11,12]. Gag-gRNA trafficking was proposed to rely either on the free diffusion of the complexes or through an endosomal pathway depending on the cells used[5,8,9,13–17].

In this assembly model, the role of GagNC is central since it directs the specific recruitment of the gRNA with its concomitant dimerization and contributes to the core condensation during or soon after virus budding[7]. Except for Spumaviruses, all retroviral NC's harbor one or two conserved CCHC domains referred to as zinc fingers (ZF) that bind zinc ion with high affinity[18]. NMR studies on HIV-1 NC revealed that each domain folds into a zinc knuckle[19,20] and that the two are close to each other forming a hydrophobic platform essential for RNA binding[21]. Mutating the conserved C or H residue for S or A caused a drastic decrease

in the affinity for Zn^{2+} impacting on NCp7 folding and gRNA packaging[22,23]. NC binds with high affinity to sequences located in the Psi sequence of the 5'UTR of the gRNA[24–28]. Nevertheless, similar affinities were observed for cellular RNAs suggesting that other parameters are involved to account for the selectively packaging of the gRNA among the bulk of cellular RNAs[29]. One of these factors could be the kinetics of Gag oligomer formation which appears to be more rapid in the presence of the viral Psi containing RNA[30]. In line with this hypothesis, zinc finger deletions caused a strong decrease in the kinetic of Gag assembly and trafficking to the PM[31], leading to intracellular Gag accumulation and particle budding defects[15,32–34]. More recently, we found that deletion of both ZFs or of the NC domain completely abolished intracytoplasmic Gag-gRNA interactions while deletion of either ZF impaired the kinetics of Gag-gRNA trafficking to the PM but not Gag-gRNA formation[11].

To better characterize the role of GagNC in the morphogenesis of the virus, we investigated the dynamics of individual Gag-gRNA clusters and cellular ultrastructure housing this nucleoprotein complexes by combining confocal microscopy with transmission electronic microscopy (TEM). A morphometric analysis of the gold bead labelling Gag and gRNA in TEM micrographs allowed to quantify the distance between Gag and gRNA. The average distance decreased as a function of time together with the increasing accumulation of the ribonucleoprotein complexes towards the PM. The shortest distances between Gag and gRNA were obtained with Gag-WT, Gag-G2A and Gag-Δp6 suggesting that the Gag-gRNA cluster was independent from Gag anchoring into the PM or Gag budding. In sharp contrast, the largest distances between Gag and gRNA were found when F16 or W37 residues were substituted for A or when H23 or H44 were changed to C. A correlation between this distance and the amount of packaged gRNA was determined. As a matter of fact, almost 25% of virions contained gRNA at 24 hours (h) post transfection (PT) and this was drastically reduced to a few % when the ZFs were deleted or mutated. All together, these results show that cytoplasmic Gag-gRNA complexes traffic toward the PM as a function of time and the quantitative analysis of our TEM images reveals that this spatio-temporal distribution is concomitant with a

condensation of the nucleoprotein complex that in turn is essential for a specific gRNA packaging.

Results

Gag and the gRNA form clusters in the cytoplasm that translocate to the PM as a function of time.

To monitor the clusters formed by HIV-1 Gag and gRNA at high resolution, we used TEM on Hela cells transfected by pNL4.3-MS2-Δenv and pMCP-eGFP-NLS (Fig. 1A). Gag was detected by anti-p24 antibody and the gRNA by the use of MCP-eGFP-NLS as already described (Fig. S1)[35,36]. Note that the pNL4.3-MS2-Δenv plasmid expressed the recombinant gRNA-MS2-Δenv that contains *cis* elements essential for gRNA encapsidation and encodes for Gag to avoid any perturbation of Gag-gRNA complex using Gag in trans[13,37].

To monitor the time-course of Gag and gRNA localization, HeLa cells were co-transfected with these two plasmids and observed at three times PT (12 h, 24 h and 48 h) by confocal microscopy (Fig. S2) and by TEM (Fig. 2). Co-expression of Gag and tagged gRNA was observed by confocal microscopy (Fig. S2). Both signals were found co-localized in merged images and mostly diffuse in the cytoplasm with an accumulation of Gag at the cell periphery in the form of red punctuates. Then, the distribution of Gag and MCP-tagged gRNA was investigated by TEM (Fig. 2). At 12 h PT, the smaller beads of 6 nm (MCP-eGFP-NLS) were mainly distributed in the nucleus and the cytoplasm (MCP bound to gRNA), depending on the cell and the expression level (Fig. 2A). The larger beads of 10 nm (Gag) were found in the cytoplasm (Fig. 2A, a). Some 10 nm beads were also detected in the nucleus but determining if these signals corresponded to the Gag precursor or to the mature p24 was not investigated. Thus, some 6 or 10 nm gold beads were found throughout the electron micrograph while others were clustered essentially in the cytoplasm (Fig. 2A, insets 1 and 2,

empty arrows). Only few if any virions were observed at the PM in agreement with the low quantity of virus produced at early time PT[38].

At 24 h and 48 h PT, the 6 nm beads were found in the nucleus (data not shown), in the cytoplasm and at the level of the PM (Fig. 2A, b and c). The 10 nm beads were found in the cytoplasm and at the cell periphery where they condensed to form virions (Fig. 2A, b and c). At these times, 6 and 10 nm beads were also clustered in the cytoplasm (Fig. 2A, inset 3, empty arrow), at the cell periphery (Fig. 2A, inset 4, empty arrow), in budding virions (Fig. 2A, inset 4, full arrow) or in released virions (Fig. 2A, insets 5 and 6, full arrows). Clusters found in virions contained at least 1 to 4 beads of each size corresponding to the gRNA packaged in Gag particles.

Taken together, these results suggest that the process of Gag and gRNA clustering starts in the cytoplasm once these viral molecules reach the cytoplasm. These clusters then move towards the PM where more Gag are added to complete assembly and form new viral particles.

Quantitative analysis of Gag-gRNA clusters.

We then determined the number of Gag-gRNA clusters and their subcellular distribution in 70 nm-thick sections. Therefore, the scale of the image was used to define a circle of 130 nm in diameter similar to that of HIV-1 particles (Fig. 2A, colored circles). Magenta circles correspond to clusters found in the cytoplasm or near the plasma membrane and red circles represent clusters found in virions. We then used this footprint as a unit of Gag-gRNA cluster to estimate the number of clusters in each electron micrograph (Fig. 2B). For each time PT, we analyzed ~50 electron micrographs obtained from three independent experiments. At 12 h PT, we counted 104 clusters in the cytoplasm (as described Fig. 2A, inset 1), meaning an average of 2.08 ± 1.03 clusters per electron micrograph. At 24 h PT, we detected 269 clusters with an average of 5.38 ± 2.84 clusters per electron micrograph, 2.82 ± 1.79 clusters were in the cytoplasm and 2.56 ± 1.96 in virions (as described in Fig. 2A, inset 4). At 48h PT, we detected 341 clusters with an average of 6.82 ± 3.63 clusters per electron micrograph, 3.62 ±

155 2.46 clusters were in the cytoplasm and 3.20 ± 2.67 in virions. Note that a significant increase
156 of Gag-gRNA clusters was observed as function of the time. Nevertheless, the ratio of clusters
157 in the cytoplasm over clusters in the virion was similar (compare black and grey boxes of Fig.
158 2B).

159 We then calculated the distance between Gag and gRNA inside the clusters. Therefore,
160 we reused the circles of 130 nm in diameter to select a mean of 90 +/- 10 regions of interest
161 (ROI) containing Gag and gRNA clusters. Beads were first detected with robust wavelet spot
162 detection[39] and classified according to their size. We then calculated the average distance of
163 10 nm to 6 nm beads to characterize their spatial distribution within the circles. We found that
164 the average distance between Gag and gRNA at 12 h, 24 h, and 48 h PT was 81.2 ± 29.7 nm,
165 61.4 ± 20.2 nm and 58.4 ± 20.5 nm respectively (Fig. 2C and Table 1). Note that this distance
166 was significantly different between 12 h and 24 h PT suggesting that Gag-gRNA was
167 condensed as function of the time and then stabilized when the assembly is completed.

168 Last, we calculated the ratio of gRNA containing particles to empty particles. Among
169 the 50 analyzed images obtained at 24 h PT, we counted 515 virions and found that 25% of
170 them were stained with 6 nm beads suggesting that a quarter of virions were filled with gRNA
171 (Table 1). The absence of tagged-gRNA in these particles could be explained by the ability of
172 Gag to se lf-assemble on cellular RNAs that are not detected in such experimental conditions[2].
173 However, at 48 h PT, among the 50 electron micrographs analyzed, we counted 597 virions.
174 We noted a clear increase in the number of released particles (Fig. 2A, compare panels b and
175 c) and 40% of the virions contained the gRNA (Table 1). Thus, the ratio of full to empty virions
176 increased between 24 h and 48 h suggesting that specific packaging of the gRNA was favored
177 by the time of expression.
178
179 **Gag-gRNA clustering does not depend on Gag membrane binding.**
180 To confirm that Gag-gRNA complexes form clusters in the cytoplasm, the glycine
181 residue at position 2 was replaced by an alanine (Gag-G2A; Fig. 1B) that abolishes Gag
182 accumulation at the PM and particle budding[40]. Production of Gag-G2A was similar to Gag-

183 WT (Fig. S3A, gel on the left) while as expected Gag-G2A was not found in the supernatant
184 (Fig. S3B, gel on the left). We observed that Gag-G2A and gRNA were co-localized in the
185 cytoplasm both by confocal microscopy (Fig. S5, b) and by TEM with many Gag-gRNA clusters
186 (Fig. 2D, insets 1 and 2). The average distance between the two partners was 51.66 nm similar
187 to that observed for Gag-WT (Table 1) indicating that the interaction between Gag and the
188 gRNA occurred in the cytoplasm and did not require Gag anchoring into the PM.
189
190 **Aromatic and histidine residues of the NC zinc fingers are important for Gag-gRNA**
191 **clustering.**
192 To investigate by TEM the mechanism of Gag-gRNA cluster formation, NC or the zinc
193 fingers were deleted. Deletion of NC or both zinc fingers is detrimental to the Gag-gRNA
194 interaction[11,12,15]. The production of the Gag-ΔNC or Gag-ΔZF1ΔZF2 mutants (Fig. 1B) in
195 transfected cells and virions was checked by Western blot 24 h PT (Fig. S3). The two truncated
196 Gag forms were equally expressed in the cell lysates (Fig. S3A, gel on the left) even though
197 Gag-ΔNC was processed in contrast to Gag-ΔZF1ΔZF2. In virions, Gag-ΔNC was two times
198 less abundant as compared with the level of WT while Gag-ΔZF1ΔZF2 was merely detected
199 (Fig. S3B, gel on the left). The reason why Gag-ΔZF1ΔZF2 was not processed remained
200 obscure but the lack of particles in the supernatant when Gag processing was impaired has
201 already been reported[41–43].
202 Then, we examined the expression of truncated Gag and gRNA by confocal microscopy
203 at 24 h PT. In agreement with previous studies, we observed truncated Gag at the PM and
204 diffuse in the cytoplasm while the gRNA was essentially located in the cytoplasm (Fig. S4b
205 and S4c)[11,12,15,31,33,34]. Next, cells expressing Gag-ΔNC (Fig. 3b, insets 1 to 3) or Gag-
206 ΔZF1ΔZF2 (Fig. 3c, insets 1 and 2) were analyzed by TEM and Gag-ΔNC or Gag-ΔZF1ΔZF2
207 and gRNA were found evenly distributed in the cytoplasm without the formation of clusters.
208 Note that in agreement with Western blot analysis (Fig. S3B) empty virions were observed for
209 Gag-ΔNC (Fig. 3b, insets 1 and 2) but not for Gag-ΔZF1ΔZF2 since in inset 3 of Fig. 3c we

merely showed a membrane protrusion[15,34]. The mean distance between each protein mutant with its cognate gRNA was 93.9 ± 29.6 nm and 105.4 ± 35.2, respectively for Gag-ΔNC or Gag-ΔZF1ΔZF2, which were statistically different from Gag-WT (Table 1). These results confirmed that NC and both zinc fingers are essential for Gag mediated recruitment of gRNA in the cytoplasm.

We then used NMR data of the complex between NCp7 and oligonucleotides to pinpoint NC residues involved in the specific recognition of the gRNA. Results showed that F16 and W37 residues located in the proximal and the distal zinc finger, respectively, were in a close vicinity in the complex and involved in stacking interactions with the nucleotide bases[26,28,44]. Mutated pNL4.3-MS2-Δenv plasmids with either the F16A, W37A or both F16AW37A substitution in GagNC domain were constructed (Fig. 1B). The Gag mutants were equally expressed in cells and supernatants as compared with WT Gag (Fig. S3A and S3B, gels on the right). Detection of Gag mutants by confocal microscopy showed Gag diffuse in the cytoplasm and accumulated at the PM (Fig. S4, second row). The Gag-F16A phenotype seemed closer to that of the WT Gag (compare Fig. S4a and Fig. S4d). Conversely, the Gag-W37A fluorescence profile seemed closer to Gag-ΔNC than to WT Gag (compare Fig. S4b and Fig. S4e). By TEM, Gag-F16A (Fig. 3d), Gag-W37A (Fig. 3e), and the double mutant Gag-F16AW37A (Fig. 3f) were found in the cytoplasm and assembled in viral particles at the level of the PM. A careful analysis of the mutant virions revealed that the ratio of particles containing gRNA to deficient particles dropped down to 18% for Gag-F16A and 9% for Gag-W37A virions, which was significantly lower than Gag-WT (25%) (Table 1). The mean distances between the 6 and 10 nm beads were 78.4 nm, 98.2 nm and 90.0 nm for Gag-F16A, Gag-W37A and Gag-F16AW37A with their cognate gRNA (Table 1). Note that the Gag-gRNA distance for Gag-F16A was only slightly increased as compare to the distance of WT-Gag and gRNA ($p < 0.1$) in contrast to that for Gag-W37A ($p < 0.001$), suggesting that the two aromatic residues are not equivalent for the recruitment of gRNA to the PM.

236 To examine the influence of the zinc finger structure on Gag-gRNA clustering, we
237 generated two Gag derivatives where the zinc ligands, histidines 23 and 44, were changed to
238 cysteine (Fig. 1B). These substitutions modify the NC structure but only slightly the binding of
239 zinc ion[45]. These H/C substitutions have a minor effect on *in vitro* NC-RNA interaction,
240 chaperone activity of NC[46–48] and on viral DNA synthesis[49–51] but have a drastic impact on virus
241 infectivity[15,22,52]. Western blot analysis showed that Gag-H23C, Gag-H44C and Gag-
242 H23CH44C were equally expressed and processed by the viral protease as WT Gag. Mutants
243 Gag-H23C and Gag-H44C were efficiently released while mutant Gag-H23CH44C was at a
244 very low level in the supernatant (Fig. S3, right panels gels). By confocal microscopy, we saw
245 no difference in the staining of Gag derivatives and cognate gRNA compared to what was
246 observed in wild type condition, so that both partners diffused into the cytoplasm and protein
247 accumulated at the PM level (Fig S4, bottom row). However, by TEM, mutated Gag-H23C,
248 Gag-H44C and Gag-H23CH44C appeared diffuse in the cytoplasm (Fig. 3, third row). Both
249 Gag-H23C and Gag-H44C were able to produce viral particles (Fig. 3g, insets 1 and 3 and Fig.
250 3h, insets 1 and 2) while only few particles were observed for Gag-H23CH44C, most of them
251 being tethered to the PM (Fig. 3i, insets 2 and 3). In addition, these protein mutants were poorly
252 clustered with the gRNA with a mean distance of 85.3 nm, 85.9 nm and 83.2 for Gag-H23C,
253 Gag-H44C and GagH23CH44C, respectively. Level of gRNA packaging in virions was 22%
254 and 14% for Gag-H23C and Gag-H44C, respectively (Table 1).
255 Taken together, these results show that mutating a single residue in either the first or second
256 zinc finger has an impact on the formation of the Gag-gRNA complexes. Furthermore, point
257 mutations in the distal zinc finger (W37 or H44) have a more pronounced effect on the
258 distance between Gag and the gRNA and on the ratio of full to empty particles than do
259 similar point mutations in the proximal zinc finger.
260
261 **The p6 domain is dispensable for Gag-gRNA clustering.**
262 NMR studies and RNA binding experiments on NCp15 (NCp7, p2 and p6) have shown
263 that p2 and p6 domains, while they are not directly involved in RNA, could modulate the binding

properties of NC domain with nucleic acid[45,53,54]. Also recent biochemical and biophysical experiments on Gag-Δp6 proposed a role of the p6 domain in the specificity of Gag-gRNA recognition and interaction[55]. More recently the group of Musier-Forsyth showed that Gag-Δp6 tightly interacts with the viral Psi RNA packaging signal[56]. This prompted us to study the contribution of a Gag deleted of the p6 domain (Gag-Δp6) to Gag-gRNA clustering. By Western blot, we found that Gag-Δp6 was less produced (Fig. S3A, gel on the left) than Gag-WT. Protein released in the medium of transfected cells was examined after ultracentrifugation. Gag-Δp6 was also found in the pellets (Fig. S3B, left panel) and may correspond to free proteins rather that virion-associated proteins[41,56]. By confocal microscopy, we observed an important co-localization of Gag-Δp6 and gRNA (Fig. S5c) and by TEM complete particles sticking to the PM were found (Fig. 4a, inset 3) in agreement with the fact that Gag-Δp6 does not recruit the ESCRT machinery necessary for the release of the viral particles from the PM[57,58]. We observed many Gag-Δp6-gRNA clusters in the cytoplasm (Fig. 4a, insets 1 and 2) and in stuck virions (Fig. 4a, inset 3). The mean distance between the 6 and 10 nm gold beads was 72.8 nm similar to that observed with WT clusters (Table 1). In conclusion, the process of Gag interaction with the gRNA is most probably independent from virus budding and release from the plasma membrane.

HIV-1 gRNA association with Gag involves an RNA domain larger than SL1.

Virus assembly upon gRNA packaging requires specific interactions between Gag and the packaging signal Psi located in the 5' untranslated region (UTR) of the gRNA. Psi is thought to encompass the stem loops SL1, SL2 and SL3 overlapping the RNA dimerization sequence[59,60]. SL1 is the dimer initiation signal (DIS) corresponding to a GC-rich sequence and adopts a kissing loop structure that facilitates the gRNA dimerization[36,61–63] and the specificity of gRNA packaging[64]. *In vitro* studies have recently shown that the SL1 stem-loop was also the primary binding site for Gag[24] which prompted us to investigate the role of SL1 in gRNA packaging in our model system. First, we showed that SL1 deletion in pNL4.3-MS2-

291 Δenv plasmid (Fig. 1A, first stem-loop in pink) had no impact on the level of cytoplasmic Gag
292 and of viral particles released in the supernatant (Fig. S3, gels on the left). Moreover, we
293 observed by confocal microscopy that SL1 deletion had not impact on gRNA nuclear export
294 as evidenced by a high level of gRNA imaged in the cytoplasm. In addition, we observed an
295 important co-localization of WT Gag and gRNA-ΔSL1 (Fig. S5, d). TEM analyses confirmed
296 the presence of Gag-gRNA-ΔSL1 clusters in the cytoplasm and close to the PM (Fig. 4b, inset
297 1). A third of viral particles contained Gag and gRNA-ΔSL1 (Fig. 4b, insets 1 and 2) and the
298 average distance between the beads was 61.8 nm, similar to that for WT particles (Table 1).
299 Next the downstream SL3 structure, known to tightly interact with NC[26] and to contain
300 nucleotide sequences essential for specific genome packaging[26,27,64–66] was deleted. The
301 plasmid pNL4.3-ΔSL1ΔSL3-MS2-Δenv was constructed (Fig. 1A, stem-loop in pink) and after
302 transfection in HeLa cells, Gag was found both in the cell and in the supernatant at a level
303 similar to that for the wild type (Fig. S3A and S3B, gels on the left). Production of Gag and
304 gRNA-ΔSL1ΔSL3 was also monitored by confocal microscopy showing a diffuse pattern in the
305 cytoplasm and at the cell periphery (Fig. S5e). In the cytoplasm few clusters of Gag-gRNA-
306 ΔSL1ΔSL3 were observed by TEM (Fig. 4c, insets 1 and 2) and the average distance between
307 Gag and gRNA-ΔSL1ΔSL3 was increased to 112.7 nm (Table 1). We observed a consequent
308 number of particles, in agreement with Western blot analysis and a significant number them
309 contained gRNA-ΔSL1ΔSL3 (16%) as compared to the 25% of WT gRNA packaged (Fig. 4c,
310 inset 3 and Table 1).
311
312 **Discussion**
313
314 According to previous studies using HeLa or Jurkat cells, the initial interactions between
315 HIV-1 Gag and gRNA kick-start assembly that take place in the cytoplasm[4,8,11,12,36,67,68] or at
316 the PM[7,36,69,70]. As shown by several studies, the zinc fingers of the NC domain play a critical
317 role in the selection of the gRNA[71]. More recently, we showed that the second ZF relatively to

318 the first one was important for the intracellular trafficking of the nucleoprotein complex to the
319 PM[11]. Here, we investigated the formation of the Gag-gRNA clusters by quantitative TEM at
320 12 h, 24 h and 48 h PT. The formation of the nucleoprotein complexes was found to start in
321 the cytoplasm leading to their accumulation at the PM. The integrity of the hydrophobic
322 platform at the tip of the zinc fingers is essential to condense Gag-gRNA clusters that favor
323 the specific packaging of the gRNA.

324 Interestingly, the high resolution of TEM microscopy allows the observation of Gag-
325 gRNA clusters and ultrastructural details of their cellular environment in cells producing the
326 virus particles. We found that at 12 h PT, Gag and the gRNA formed clusters close to the
327 nuclear envelope and in the cytoplasm suggesting that the gRNA associates with Gag most
328 likely soon after its synthesis and nuclear export. At 24 h and 48 h PT, an increase of Gag-
329 gRNA clusters was observed in the vicinity of the PM. We cannot completely exclude that the
330 Gag-gRNA interactions occur directly at the PM as observed by TIRF (Total Internal Reflection
331 Fluorescence microscopy)[7,72] but such clusters were hardly seen 12 h PT. In accordance with
332 an early cytoplasmic interaction, in the Feline Immunodeficiency Virus model, Gag and the
333 gRNA were found at the rim of the nucleus, suggesting that FIV Gag might bind to the gRNA
334 after its nuclear export via the nuclear pore[42]. In addition, the group of Lever found an
335 interaction between Gag and the HIV-1 gRNA in the perinuclear region and proposed that the
336 centrosomal localization of the ribonucleoprotein could facilitate Gag mediated gRNA
337 packaging[68]. Both, the nuclear pore and the centriole architecture have been extensively
338 studied by electron microscopy[73,74] but in our hands Gag-gRNA clusters were not specifically
339 observed at the vicinity of either the centriole or nuclear pore. The localization of Gag-gRNA
340 clusters close to centrioles may be a rare event merely observable by TEM. Meanwhile we
341 found few Gag-gRNA clusters in MVB (data not shown). This result was anticipated since
342 subcellular accumulation of HIV-1 particles in MVB varies according to the cell type and, as in
343 Jurkat T cells, most of the newly made Gag in Hela is targeted to the PM[75–77] while in
344 macrophages HIV-1 accumulates preferentially in vesicles also referred to as intracellular
345 plasma membrane-connected compartments (IPMCs)[78].

346 At 24 h PT, about 25% of the particles contain the gRNA and 40% at 48h PT indicating
347 that the majority of the viral particles lacks the viral gRNA. Instead, these particles contain a
348 mix of cellular RNA in agreement with the fact that Gag can interact with cellular RNAs[29,64,79,80].
349 It remains that our results differ from previous studies where 75-90% of the HIV-1 particles
350 contain the Psi RNA[7,81,82]. This difference could result from the high expression of Gag *in trans*
351 in previous work while in the present work the Gag was expressed *in cis*.
352 An original aspect of our approach is that we were able to provide quantitative data by
353 processing TEM images. For this purpose, we developed a bead detection model for TEM
354 images built upon a method initially used for robust spot detection in fluorescence microscopy
355 [39] and this image processing approach was implemented on Matlab. This allowed to objectively
356 and semi-automatically evaluate the distance between Gag and the gRNA as function of time
357 and of the type of mutants. In the Gag-gRNA clusters the distance between the two
358 components was ~60 nm at 24 h PT in agreement with the size of the particles. In order to
359 further validate this distance and to estimate the distribution of each partner, we used Gag-
360 G2A that was previously found to tightly interact with the gRNA[11,12] and a value of 51.7 ± 21
361 nm was found (Fig. 2D). Interestingly, the mean distance between Gag and gRNA decreased
362 between 12 h and 48 h PT (Fig. 2C, Table 1), suggesting that during the nucleoprotein
363 transport in the cytoplasm to reach the PM the Gag-gRNA clusters tend to undergo a
364 condensation phenomenon.
365 Next, we studied if the distance between Gag and the gRNA was related to the amount
366 of packaged gRNA found in the virus pellets (Table 1). For Gag-ΔNC or Gag-ΔZF1ΔZF2 this
367 distance was around 100 nm and viral particles did not contain the gRNA. These results
368 obtained with our tagged RNA model are in full agreement with those obtained on infectious
369 viruses[65] where it was shown that the absence of one of the two fingers or the point mutation
370 H23C or H44C decreased the amount of viral RNA encapsidated in favor of cellular RNA.
371 Thus, our result emphasizes the essential role of GagNC in HIV-1 gRNA packaging. In
372 addition, we noted that point mutations in the first finger (F16A and H23C) caused a small
373 increase of the distance to ~80 nm and at the same time gRNA containing particles slight

decrease as compared to that obtained for the wild type Gag protein. Similar point mutations were performed in the second zinc finger (W37A and H44C) causing a larger distance between Gag and the gRNA to be around ~ 90-95 nm accompanied with a larger drop of packaged gRNA in virion pellets. Taken together, the two mutations in the first finger appear to have a smaller effect than similar mutations in the second finger and confirms that both zinc finger do not have the same function during the assembly[11,22,83,84].

The relative importance of the proximal finger of the NC as compared to the distal in RNA recognition is clearly supported by recent NMR data showing that ZF2 is more prone to interact with RNA than ZF1[85,86]. It should be noted that these point mutations in each ZF do not have as great an effect as the deletion of the GagNC (Fig. 3). Indeed, if the structure of the zinc finger motifs directs the intercalation of these two aromatic residues in the nucleic bases, the spatial proximity of the dactyl motifs in NCp7 allows the formation of a large hydrophobic plateau including V13, F16, I24, A25 in ZF1 and W37, G45 and M46 in ZF2 that reinforces this GagNC-RNA interaction[26,28]. Thus, the loss of the two aromatic residues would be partially compensated by the presence of other residues of the hydrophobic plateau.

Recent study showed that the p6 domain of Gag was important to discriminate specific from nonspecific RNAs *in vitro*[55] while another one indicated that Gag and Gag-Δp6 interact similarly with Psi containing RNA and promoting gRNA packaging[56]. A careful analysis of cells expressing Gag-Δp6 revealed large amounts of clusters composed by Gag-Δp6 and the gRNA with a mean distance of 72.8 nm. As anticipated these clusters were only found in the cytoplasm in agreement with the role of p6 in virus budding (Fig. 4a)[58]. These findings indicate that the p6 domain is most probably not involved in the specific interaction between Gag and the gRNA.

How is the gRNA recognized by Gag? This has been extensively studied showing that Huanstem-loops (SL) located in the 5'UTR play a critical role in RNA dimerization and packaging. For example, deletion of SL1 or mutations in the SL1 DIS cause a moderate decrease of genomic RNA packaging[64,87–89] while others showed that such mutations leave genome packaging unaffected[90,91]. In addition, a specific interaction between Gag and the SL1

402 stem-loop was found[24]. In the present study, we show by TEM the presence of numerous Gag-
403 gRNA-ΔSL1 clusters (Fig. 4b) with an average distance between the two partners and a ratio
404 of empty to full particles identical to what was found for WT Gag-gRNA. Even though the data
405 provided by TEM cannot quantify the affinity between Gag and gRNA-ΔSL1 this result
406 suggests that SL1 is not the main cis-acting factor for RNA packaging. On the other hand, SL1
407 is essential for Gag directed gRNA dimerization as shown *in vitro*[81,82,92,93] and in cell[36,69],
408 suggesting that the gRNA-ΔSL1 encapsidated in virions (Fig 4b) is monomeric in the viral
409 particle[91,94,95].

410 Deletion of SL3 together with SL1 caused a significant decrease of Gag-gRNA clusters
411 and packaged gRNA (Table 1, Fig. 4c). These data are in agreement with series of reports
412 showing that SL3 is an important signal for RNA packaging[64] in line with the fact that GagNC
413 tightly binds to sequences at the apical loop and the base of Psi hairpin[26,96]. Nevertheless, our
414 results on Gag-gRNA cluster formation shows that SL3 deletion does not have a drastic effect
415 on gRNA packaging; this could be interpreted by the fact that Gag can interact with multiple
416 sequences in addition to SL1 and SL3, notably SL2[97] and to several distinct stretches located
417 in the UTR[65,98] and in the RRE domain[99,100]. In addition, Rein's group showed recently that the
418 presence of SL3 in the LTR increases the kinetics of assembly and consequently the efficiency
419 of viral particles competent for the replication so that the removal of SL3 in our construction
420 could result in a decrease of encapsidation but not to the complete inhibition[30].

421 In conclusion, data presented sheds new light on HIV-1 assembly. They confirm that in
422 HeLa cells, Gag molecules initially interact with the gRNA in the cytoplasm. Using a method to
423 calculate the distance between Gag and the gRNA, we show that during Gag-gRNA complex
424 trafficking to the plasma membrane a condensation process takes place, most probably in a
425 membrane-less mode directed by NC[101]. Moreover, packaging of the gRNA is far from being
426 efficient possibly due to a nonspecific RNA binding activity of GagNC. At least if both zinc
427 fingers are essential in Gag for gRNA packaging they are not fully equivalent. Overall, our
428 original approach based on morphometric analysis of gold beads in TEM coupled to quantify

Gag-gRNA colocalization could be used to study other viral assembly models or more generally RNA/protein interactions.

Methods

Plasmid DNA.

Plasmids pNL4.3-MS2-Δenv, pNL4.3-ΔZF1ΔZF2-MS2-Δenv and pNL4.3-ΔSL1-MS2-Δenv, containing 24 repetitions of MS2 stem-loop in the pol gene of the NL4.3 backbone, were described(Ferrer et al., 2016). The pNL4.3-ΔNC-MS2-Δenv mutant was generated from pNL4.3-MS2-Δenv plasmid by deletion of the NC domain using PCR-based deletion mutagenesis with forward primer 5'-ACCATAATGCAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATC-3' and reverse primer 5'-TAAAAAATTAGCCTGCATTATGGTAGCTGGATTTGTTAC-3'. The pNL4.3-H23C-MS2-Δenv and pNL4.3-H44C-MS2-Δenv were constructed using PCR Site-Directed Mutagenesis with the forward primer 5'-AAAGAAGGGTGCATAGCCAAAAATTGC-3' and the reverse primer 5'-GCCACAATTGAAACACTTAACAGTC-3' for H23C and forward primer 5'-AGGAAGGATGCCAAATGAAAGATTGTACTG-3' and reverse primer 5'-TTCCACATTTCCAACAGCCCTT-3' for H44C. The pNL4.3-F16A-MS2-Δenv and pNL4.3 W37A-MS2-Δenv were constructed using PCR Site-Directed Mutagenesis with forward primer 5'-TGTTAAGTGTGCCAATTGTGGCAA-3' and reverse primer 5'-GTCTTTCTTTGGTTCCTAAAATTG-3' for F16A and forward primer 5'-AAAGGGCTGTGCGAAATGTGGAAAGGAAGG-3' and reverse primer 5'-TTCCTAGGGGCCCTGCAAT-3' for W37A. The pNL4.3-G2A-MS2-Δenv derivate was constructed using PCR Site-Directed Mutagenesis with forward primer 5'-AGAGAGATGGCTGCGAGAGC-3' and reverse primer 5'-CCTTCTAGCCTCCGCTAGTCA-3'. The pNL4.3-Δp6-MS2-Δenv was constructed by inducing a stop codon in p6 domain using forward primer 5'-TTCTTTAGAGCTGACCATAGCCAACAG-3' and reverse primer 5'-AATTCCCTGGCCTTCCCTTGTG-3'. The pNL4-3-ΔSL1ΔSL3-MS2-Δenv derivate was generated from pNL4-3-ΔSL1-MS2-Δenv plasmid by deletion of the SL3 stem-loop using PCR-

456 based deletion mutagenesis using forward primer 5'-
457 AAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCG-3' and reverse primer 5'-
458 TCAAAATTTTTGGCGTACTCACCAGTCGCC-3'.
459 The MCP-eGFP-NLS sequence was obtained from Querido and Chartrand, Montreal, and
460 included in a pCDNA3.1(+) DNA backbone using NheI and HindIII restriction sites. The
461 integrity of all plasmid constructs was assessed by DNA sequencing.
462
463 **Cell culture and DNA transfection.**
464 HeLa cells were grown at 37°C/5%CO_2 in Dublecco's modified Eagle medium (DMEM)
465 supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, France) and 1% antibiotic mixture (Invitrogen
466 Corporation Pontoise, France). HeLa cells were transfected with a mixture of pNL4.3-MS2-
467 Δenv plasmid or derivatives with MCP-eGFP-NLS plasmid (ratio 0.6/0.4) by incubating cells
468 with 2 µg of DNA plasmids for confocal microscopy or 10 µg of plasmid for TEM with jetPEI^{TM}
469 (Life Technologies, Saint Aubin, France).
470
471 **Western blot**
472 HeLa cells were washed 24 h post-transfection with phosphate buffered saline (PBS), and
473 resuspended in ice-cold RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40,
474 0.15% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 0.05% SDS supplemented with a complete anti-
475 protease cocktail from Thermofisher). 50 µg of total protein were heat denaturated, loaded on
476 a 12% SDS-PAGE and transferred onto PDVF membrane (Amersham, Orsay, France).
477 Membranes blocked by non-fat milk were probed by a monoclonal anti-p24 antibody (NIH AIDS
478 Reagent, ref 6521) and revealed by ECL with horseradish peroxidase-conjugated secondary
479 antibodies on an ImageQuant LAS500 apparatus (GE Healthcare). Protein levels were
480 standardized against GAPDH (Bio-techne, ref NB100-56875).
481 Virus pellets were obtained by ultracentrifugation through a 20% sucrose gradient (AH-629
482 rotor for 1h30 at 28000 rpm) and resuspended in 1X PBS. The p24 concentration was

determined using Innotest HIV Antigen mAb kit (Fujirebio). 400 ng of p24 were heat denaturated and Western blot was performed as above described.

Confocal Microscopy.

HeLa cells were fixed by 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% X100 Triton/1X PBS for 20 min. Cells were blocked for 30 min with 0.2% BSA in 1X PBS, incubated with anti-p24 Gag antibody (NIH AIDS Reagent, ref 6521) and then with Alexa Fluor 594 goat-anti-mouse antibody (ThermoFisher Scientific). DNA was stained with DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, SIGMA) (1mg/ml, 1:10000). Fluorescence confocal images were taken using a confocal microscope LEICA SP8 gSTED equipped with 60x PL APO 1.30 CS2 Oil and laser diode at 405 nm for DAPI, argon laser at 488 nm for Alexa 488 and white laser at 594 nm for Alexa 594.

Cell sorting by FACS

Transfected HeLa cells were treated with trypsin, resuspended in ice-cold complete medium (DMEM, 10% FBS) and then sorted into 5 mL tubes. A gating was done using the BD FACS ChorusTM software (BD Biosciences). Cell sorting was performed with a 100 µm nozzle and sorted directly into 1.5 mL tubes containing complete medium to minimize cell stress. After establishing the basic gating parameters, GFP positive cells (3.10^5 to 1.10^6) of each population of interest were sorted at a speed of 6000 cells/s.

Immuno-electron Microscopy according to the Tokuyasu method.

HeLa cells expressing pNL4.3-MS2-Δenv or derivate plasmids for 24 h were sorted and fixed for 2 h at 4°C with 4% paraformaldehyde / 0.1% glutaraldehyde in Sorensen phosphate buffer (pH 7.6), washed twice with PBS (pH 7.6) and included in 12% gelatin. Infusion with 2.3M sucrose was perform overnight at 4°C before ultrathin cryo-sectioning at -100°C on a Leica Microsystems FC7 cryo-ultramicrotome. Sections of 70 nm thickness were retrieved with a 2%

methylcellulose / 2.3M sucrose mixture (1:1) and collected onto formvar/carbon-coated nickel grids.

Immunogold Labeling on ultrathin cryosections.

After removal of gelatin at 37°C, sections were saturated with BSA© (Aurion, Wageningen, the Netherlands) for 30 min at room temperature. After washing in PBS-0.1% BSA© (three washes of 5 min each), sections were incubated with PBS-0.1% BSA© containing 1:400 Mouse HIV-1 anti-p24 monoclonal antibody (NIH AIDS Reagent, ref 6521) and 1:200 Rabbit anti-GFP monoclonal antibody (Abcam, ab6556). After six washes of PBS-0.1% BSA© (5 min each), the grids were incubated with PBS-0.1% BSA© containing 1:60 gold-conjugated Goat anti-Mouse (10 nm) and 1:50 6 nm gold-conjugated Goat anti-Rabbit (Aurion, Wageningen, the Netherlands). The grids were finally washed six times in PBS-0.1% BSA© (5 min each), six times in PBS (5 min each), and rinsed three times with distilled water. The contrasting step was performed by incubating grids in a 2% uranyl acetate/ 2% methylcellulose mixture (1:10) for 10 min at room temperature. The sections were imaged with a transmission electron microscope at 100 kV (JEOL 1011).

Measurement of distances between gold beads in TEM.

The picture's dynamic has been modified non-linearly in order to improve beads contrast. The method is based on a "à trou" wavelet decomposition of the picture followed by thresholding of non-significant coefficients and multi-scale correlation. This approach allows a bead detection while being more robust to noise and local textures. Non-circular spots have been eliminated, then bead surfaces have been converted in their equivalent diameter and separated between two classes considering the pixel size and after analyzing their distribution. For each 6 nm bead, we calculated the minimal distance to a 10 nm bead. Then we averaged these minimal distances to characterize the relative spatial distribution of the beads.

Statistical analysis.

Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Results are expressed as mean ± SD (standard deviation) obtained from images from three independent experiments. To determine the statistical significance of the data, two-tailed Mann-Whitney test was applied according to normality of data and homoscedasticity of variance determined by Shapiro-Wilk test and F test, respectively. All p values less than 0.1 were considered as significant.

Acknowledgments

This is work was supported by the *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales* (ANRS) (ECTZ47595). Stéphanie Durand is supported by a fellowship from the Tours University and *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales* (ANRS). We gratefully acknowledge the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH for the HIV-1 anti-p24 antibody. We thank Jean-Luc Darlix and Olivier Mauffret for fruitful discussion. We also thank all the members of the Electron Microscopy platform (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support, especially Pierre-Ivan Raynal and Juliette Rousseau. We thank Cyrille Hoarau from the B Cell Resources (BCR) Facility of Tours University for technical support.

Figure Legends

Fig. 1 Scheme of HIV-1 gRNA-MS2-Δenv and Gag or Gag derivatives. A: HIV-1 gRNA-MS2-Δenv is expressed from pNL4.3-MS2-Δenv plasmid and is translated under the control of HIV-1 LTR promotor in all viral genes except *pol* and *env*. The 5' UTR contains highly structured regions important for HIV-1 replication, notably four stem-loops (SL1 to SL4). This gRNA-MS2-Δenv is detected with the insertion of 24 stem-loops (orange symbols) of the MS2 bacteriophage in the pol gene interacting with MCP-eGFP-NLS proteins (green circles). B: HIV-1 Gag domains are shown as empty boxes while NC is represented by its primary

sequence. Deletion of each domain is symbolized by a bridge that links the flanking sequences. Substitution mutants are shown with their position and the replacing amino acid.

Fig. 2 Dual immunolabelling of HIV-1 Gag and gRNA as function of the time by transmission electron microscopy and morphometric analysis of Gag-gRNA clusters. A: HeLa cells were transiently transfected with a mixture of DNA plasmids expressing gRNA-MS2-Δenv and MCP-eGFP-NLS protein (Ratio 0.6/0.4). After 12 h (A), 24 h (B) or 48 h (C) of expression, cells were GFP-based sorted, fixed by 4% PFA, embedded in gelatin and cryo-protected in 2.3M sucrose. Ultrathin sections were cutted and incubated first with a mixture of mouse anti-p24 and rabbit anti-GFP antibodies, and then with anti-mouse and anti-rabbit antibodies conjugated with 10 nm and 6 nm gold particles respectively. Circles of 130 nm in diameters correspond to Gag-gRNA clusters found in the cytoplasm (magenta) or in virions (red). Insets 1-6 show Gag-gRNA clusters, either free in the cytoplasm (hollow arrow) or associated with a nascent virion (full arrow). Scale is reported at the bottom left. Note that at early PT time Gag-gRNA clusters localized in the cytoplasm while at later PT Gag-gRNA clusters are found in the virions. B: Quantification of Gag-gRNA clusters in cytoplasm and in viruses at each time PT. The data represent the mean ± the standard error of the mean (SEM) n = 50 cells from three independent experiments. The p values were obtained from Mann-Whitney test to compare the mean values (ns: non-significative, *: $p<0.1$, ***: $p<0.001$). C: Histogram represents the mean distances between Gag and gRNA in each cluster by the measurement of the distance between each 10 nm gold bead and the surrounding 6 nm gold bead at three times PT. The beads distribution has been analyzed bioinformatically. The data shown are the mean ± the SEM from n= 90 cells from 3 independent experiments. The p values were obtained from Mann-Whitney tests to compare the mean distances (ns: non-significative, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$). D: HeLa cells were transiently transfected with a mixture of DNA plasmids expressing gRNA-G2A-MS2-Δenv and MCP-eGFP-NLS protein (Ratio 0.6/0.4) and analyzed as previously described by TEM. Nu: Nucleus. Cy: Cytoplasm. PM: Plasma Membrane

Fig. 3 Impact of NC deletions or ZF punctual mutations on HIV-1 Gag and gRNA clustering, monitored by TEM. HeLa cells were co-transfected with a mixture of modified pNL4.3-MS2-Δenv encoding for Gag (a), Gag-ΔNC (b), Gag-ΔZF1ΔZF2 (c), Gag-F16A (d), Gag-W37A (e), Gag-F16AW37A (f), Gag-H23C (g), Gag-H44C (h) or Gag-H23CH44C (i) and a plasmid expressing the MCP-eGFP-NLS protein. Cells were observed 24h PT by TEM. Cells were prepared and stained as presented in Fig. 2. Each panel shows the major observed phenotype. For each image, insets 1-3 show clusters of Gag and gRNA-MS2-Δenv either free in the cytoplasm (hollow arrow) or associated with a nascent VLP (full arrow).

Fig. 4 Impact of HIV-1 Gag or gRNA mutations on Gag-gRNA clustering, monitored by TEM. HeLa cells were co-transfected with a mixture of modified pNL4.3-MS2-Δenv encoding for Gag-Δp6 (a), gRNA-ΔSL1 (b) or gRNA-ΔSL1ΔSL3 (c) and a plasmid expressing the MCP-eGFP-NLS protein. Cells were prepared and stained as presented in Fig. 2. Each panel shows the major observed phenotype. For each image, insets 1-3 show clusters of Gag and gRNA-MS2-Δenv either free in the cytoplasm (hollow arrow) or associated with a nascent virus (full arrow).

References

1. Sundquist, W. I. & Krausslich, H.-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006924–a006924 (2012).
2. Comas-Garcia, M., Davis, S. & Rein, A. On the Selective Packaging of Genomic RNA by HIV-1. *Viruses* **8**, 246 (2016).
3. Ono, A. HIV-1 assembly at the plasma membrane: Gag trafficking and localization. *Future Virol.* **4**, 241–257 (2009).
4. Kutluay, S. B. & Bieniasz, P. D. Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. *PLoS Pathog.* **6**, e1001200 (2010).

5. Chen, J. *et al.* Cytoplasmic HIV-1 RNA is mainly transported by diffusion in the presence or absence of Gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E5205–E5213 (2014).
6. Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.-L. & Muriaux, D. Assembly of Infectious HIV-1 in Human Epithelial and T-Lymphoblastic Cell Lines. *J. Mol. Biol.* **359**, 848–862 (2006).
7. Jouvenet, N., Simon, S. M. & Bieniasz, P. D. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19114–19119 (2009).
8. Kemler, I., Meehan, A. & Poeschla, E. M. Live-Cell Coimaging of the Genomic RNAs and Gag Proteins of Two Lentiviruses. *J. Virol.* **84**, 6352–6366 (2010).
9. Molle, D. *et al.* Endosomal Trafficking of HIV-1 Gag and Genomic RNAs Regulates Viral Egress. *J. Biol. Chem.* **284**, 19727–19743 (2009).
10. Perlman, M. & Resh, M. D. Identification of an Intracellular Trafficking and Assembly Pathway for HIV-1 Gag: HIV-1 Gag Trafficking Pathway. *Traffic* **7**, 731–745 (2006).
11. Boutant, E. *et al.* Zinc Fingers in HIV-1 Gag Precursor Are Not Equivalent for gRNA Recruitment at the Plasma Membrane. *Biophys. J.* **119**, 419–433 (2020).
12. Hendrix, J. *et al.* Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J. Cell Biol.* **210**, 629–646 (2015).
13. Becker, J. T. & Sherer, N. M. Subcellular Localization of HIV-1 gag-pol mRNAs Regulates Sites of Virion Assembly. *J. Virol.* **91**, e02315-16, e02315-16 (2017).
14. Booth, A. M. *et al.* Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* **172**, 923–935 (2006).
15. Grigorov, B. *et al.* Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* **4**, 54 (2007).
16. Sherer, N. M. *et al.* Visualization of Retroviral Replication in Living Cells Reveals Budding into Multivesicular Bodies: **Retroviral Budding**. *Traffic* **4**, 785–801 (2003).
17. Welsch, S. *et al.* HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages. *PLoS Pathog.* **3**, e36 (2007).

18. Mely, Y. *et al.* Investigation of zinc-binding affinities of moloney murine leukemia virus nucleocapsid protein and its related zinc finger and modified peptides: ZINC-BINDING AFFINITIES OF MoMuLV NCp10. *Biopolymers* **31**, 899–906 (1991).
19. Morellet, N. *et al.* Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *EMBO J.* **11**, 3059–3065 (1992).
20. Summers, M. F. *et al.* Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci.* **1**, 563–574 (1992).
21. Mouhand, A. *et al.* Overview of the Nucleic-Acid Binding Properties of the HIV-1 Nucleocapsid Protein in Its Different Maturation States. *Viruses* **12**, 1109 (2020).
22. Aldovini, A. & Young, R. A. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**, 1920–1926 (1990).
23. Gorelick, R. J. *et al.* Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* **64**, 3207–3211 (1990).
24. Abd El-Wahab, E. W. *et al.* Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. *Nat. Commun.* **5**, 4304 (2014).
25. Clever, J. L., Miranda, D. & Parslow, T. G. RNA Structure and Packaging Signals in the 5J Leader Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. *J VIROL* **76**, 7 (2002).
26. De Guzman, R. N. Structure of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Bound to the SL3 -RNA Recognition Element. *Science* **279**, 384–388 (1998).
27. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. & Sodroski, J. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**, 4085–4087 (1989).
28. Morellet, N. *et al.* Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J. Mol. Biol.* **283**, 419–434 (1998).

29. Comas-Garcia, M. *et al.* Dissection of specific binding of HIV-1 Gag to the 'packaging signal' in viral RNA. *eLife* **6**, e27055 (2017).
30. Comas-Garcia, M. *et al.* Efficient support of virus-like particle assembly by the HIV-1 packaging signal. *eLife* **7**, e38438 (2018).
31. El Meshri, S. E. *et al.* 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 (2015).
32. 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 (2015).
33. Derdowski, A., Ding, L. & Spearman, P. A Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay Demonstrates that the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pr55Gag I Domain Mediates Gag-Gag Interactions. *J. Virol.* **78**, 1230–1242 (2004).
34. Hogue, I. B., Hoppe, A. & Ono, A. Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag-Gag Interaction: Relative Contributions of the CA and NC Domains and Membrane Binding. *J. Virol.* **83**, 7322–7336 (2009).
35. Bertrand, E. *et al.* Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast. *Mol. Cell* **2**, 437–445 (1998).
36. Ferrer, M. *et al.* Imaging HIV-1 RNA dimerization in cells by multicolor super-resolution and fluctuation microscopies. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7922–7934 (2016).
37. Nikolaitchik, O., Rhodes, T. D., Ott, D. & Hu, W.-S. Effects of Mutations in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene on RNA Packaging and Recombination. *J. Virol.* **80**, 4691–4697 (2006).
38. Jouvenet, N., Bieniasz, P. D. & Simon, S. M. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* **454**, 236–240 (2008).
39. Olivo-Marin, J.-C. Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognit.* **35**, 1989–1996 (2002).

40. Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5781–5785 (1989).
41. Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**, 6810–6818 (1995).
42. Kaplan, A. H. *et al*. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J. Virol.* **67**, 4050–4055 (1993).
43. Pettit, S. C. *et al.* The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.* **68**, 8017–8027 (1994).
44. Bazzi, A. *et al.* Structural insights into the cTAR DNA recognition by the HIV-1 nucleocapsid protein: role of sugar deoxyriboses in the binding polarity of NC. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3903–3916 (2011).
45. Demene, H. *et al.* 1H NMR structure and biological studies of the His23 .fwdarw. Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 indicate that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. *Biochemistry* **33**, 11707–11716 (1994).
46. Beltz, H. *et al*. Structural Determinants of HIV-1 Nucleocapsid Protein for cTAR DNA Binding and Destabilization, and Correlation with Inhibition of Self-primed DNA Synthesis. *J. Mol. Biol.* **348**, 1113–1126 (2005).
47. Darlix, J.-L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H. & Roques, B. P. First Glimpses at Structure-function Relationships of the Nucleocapsid Protein of Retroviruses. *J. Mol. Biol.* **254**, 523–537 (1995).
48. Guo, J. *et al.* Subtle Alterations of the Native Zinc Finger Structures Have Dramatic Effects on the Nucleic Acid Chaperone Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein. *J. Virol.* **76**, 4370–4378 (2002).

731 49. Buckman, J. S., Bosche, W. J. & Gorelick, R. J. Human Immunodeficiency Virus Type 1
732 Nucleocapsid Zn22 Fingers Are Required for Efficient Reverse Transcription, Initial
733 Integration Processes, and Protection of Newly Synthesized Viral DNA. *J VIROL* **77**, 12
734 (2003).
735 50. Didierlaurent, L., Houzet, L., Morichaud, Z., Darlix, J.-L. & Mougel, M. The conserved N-
736 terminal basic residues and zinc-finger motifs of HIV-1 nucleocapsid restrict the viral
737 cDNA synthesis during virus formation and maturation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4745–
738 4753 (2008).
739 51. Tanchou, V. *et al.* Role of the N-Terminal Zinc Finger of Human Immunodeficiency Virus
740 Type 1 Nucleocapsid Protein in Virus Structure and Replication. *J. Virol.* **72**, 4442–4447
741 (1998).
742 52. Gorelick, R. J. *et al.* Strict Conservation of the Retroviral Nucleocapsid Protein Zinc Finger
743 Is Strongly Influenced by Its Role in Viral Infection Processes: Characterization of HIV-1
744 Particles Containing Mutant Nucleocapsid Zinc-Coordinating Sequences. *Virology* **256**,
745 92–104 (1999).
746 53. Tanwar, H. S. *et al.* The thermodynamics of Pr55Gag-RNA interaction regulate the
747 assembly of HIV. *PLOS Pathog.* **13**, e1006221 (2017).
748 54. Wang, W. *et al.* Distinct nucleic acid interaction properties of HIV-1 nucleocapsid protein
749 precursor NCp15 explain reduced viral infectivity. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7145–7159
750 (2014).
751 55. Dubois, N. *et al.* The C-terminal p6 domain of the HIV-1 Pr55 ^{Gag} precursor is required for
752 specific binding to the genomic RNA. *RNA Biol.* **15**, 923–936 (2018).
753 56. Sarni, S. *et al.* HIV-1 Gag protein with or without p6 specifically dimerizes on the viral
754 RNA packaging signal. *J. Biol. Chem.* **295**, 14391–14401 (2020).
755 57. Freed, E. O. The HIV–TSG101 interface: recent advances in a budding field. *Trends*
756 *Microbiol.* **11**, 56–59 (2003).
757 58. Rose, K. M., Hirsch, V. M. & Bouamr, F. Budding of a Retrovirus: Some Assemblies
758 Required. *Viruses* **12**, 1188 (2020).

59. Kuzembayeva, M., Dilley, K., Sardo, L. & Hu, W.-S. Life of psi: How full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology* **454–455**, 362–370 (2014).

60. Rein, A. RNA Packaging in HIV. *Trends Microbiol.* **27**, 715–723 (2019).

61. Clever, J., Sassetti, C. & Parslow, T. G. RNA Secondary Structure and Binding Sites for gag Gene Products in the 5J Packaging Signal of Human Immunodeficiency Virus Type. *J VIROL* **69**, 9 (1995).

62. Keane, S. C. *et al.* Structure of the HIV-1 RNA packaging signal. *Science* **348**, 917–921 (2015).

63. Paillart, J. C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. A loop-loop 'kissing' complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5572–5577 (1996).

64. Houzet, L. *et al.* HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2695–2704 (2007).

65. Didierlaurent, L. *et al.* 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 (2011).

66. Luban, J. & Goff, S. P. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Virol.* **68**, 3784–3793 (1994).

67. Moore, M. D. *et al.* Dimer Initiation Signal of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Its Role in Partner Selection during RNA Copackaging and Its Effects on Recombination. *J. Virol.* **81**, 4002–4011 (2007).

68. Poole, E., Strappe, P., Mok, H.-P., Hicks, R. & Lever, A. M. L. HIV-1 Gag-RNA Interaction Occurs at a Perinuclear/Centrosomal Site; Analysis by Confocal Microscopy and FRET: HIV-1 Gag-RNA Interaction Occurs in a Perinuclear Region. *Traffic* **6**, 741–755 (2005).

69. Chen, J. *et al.* HIV-1 RNA genome dimerizes on the plasma membrane in the presence of Gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E201–E208 (2016).

70. Sardo, L. *et al.* Dynamics of HIV-1 RNA Near the Plasma Membrane during Virus Assembly. *J. Virol.* **89**, 10832–10840 (2015).
71. Jouvenet, N., Simon, S. M. & Bieniasz, P. D. Visualizing HIV-1 Assembly. *J. Mol. Biol.* **410**, 501–511 (2011).
72. Ivanchenko, S. *et al.* Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLoS Pathog.* **5**, e1000652 (2009).
73. LeGuennec, M., Klena, N., Aeschlimann, G., Hamel, V. & Guichard, P. Overview of the centriole architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **66**, 58–65 (2021).
74. von Appen, A. & Beck, M. Structure Determination of the Nuclear Pore Complex with Three-Dimensional Cryo electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **428**, 2001–2010 (2016).
75. Finzi, A., Orthwein, A., Mercier, J. & Cohen, É. A. Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly Takes Place at the Plasma Membrane. *J. Virol.* **81**, 7476–7490 (2007).
76. Jouvenet, N. *et al.* Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly. *PLoS Biol.* **4**, e435 (2006).
77. Ono, A. & Freed, E. O. Cell-Type-Dependent Targeting of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly to the Plasma Membrane and the Multivesicular Body. *J. Virol.* **78**, 1552–1563 (2004).
78. Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M. & Jouve, M. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* **7**, 29 (2010).
79. Dilley, K. A. *et al.* Interactions between HIV-1 Gag and Viral RNA Genome Enhance Virion Assembly. *J. Virol.* **91**, e02319-16, e02319-16 (2017).
80. Rulli, S. J. *et al.* Selective and Nonselective Packaging of Cellular RNAs in Retrovirus Particles. *J. Virol.* **81**, 6623–6631 (2007).
81. Chen, J. *et al.* High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13535–13540 (2009).

82. Dilley, K. A. *et al.* Determining the Frequency and Mechanisms of HIV-1 and HIV-2 RNA Copackaging by Single-Virion Analysis. *J. Virol.* **85**, 10499–10508 (2011).

83. Gorelick, R. J., Chabot, D. J., Rein, A., Henderson, L. E. & Arthur, L. O. The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *J. Virol.* **67**, 4027–4036 (1993).

84. Schwartz, M. D., Fiore, D. & Panganiban, A. T. Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. *J. Virol.* **71**, 9295–9305 (1997).

85. Retureau, R., Oguey, C., Mauffret, O. & Hartmann, B. Structural Explorations of NCp7–Nucleic Acid Complexes Give Keys to Decipher the Binding Process. *J. Mol. Biol.* **431**, 1966–1980 (2019).

86. Zargarian, L. *et al.* Dynamics of Linker Residues Modulate the Nucleic Acid Binding Properties of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Zinc Fingers. *PLoS ONE* **9**, e102150 (2014).

87. Berkhout, B. & Van Wamel, J. L. B. The leader of the HIV-1 RNA genome forms a compactly folded tertiary structure. *RNA* **6**, 282–295 (2000).

88. Haddrick, M., Lear, A. L., Cann, A. J. & Heaphy, S. Evidence that a Kissing Loop Structure Facilitates Genomic RNA Dimerisation in HIV-1. *J. Mol. Biol.* **259**, 58–68 (1996).

89. Laughrea, M. *et al.* Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J. Virol.* **71**, 3397–3406 (1997).

90. Hill, M. K. *et al.* The Dimer Initiation Sequence Stem-Loop of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Dispensable for Viral Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Virol.* **77**, 8329–8335 (2003).

91. Shen, N., Jetté, L., Liang, C., Wainberg, M. A. & Laughrea, M. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Dimerization on Viral Infectivity and of Stem-Loop B on RNA Dimerization and Reverse Transcription and Dissociation of Dimerization from Packaging. *J. Virol.* **74**, 5729–5735 (2000).

92. Rein, A., Datta, S. A. K., Jones, C. P. & Musier-Forsyth, K. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem. Sci.* S0968000411000545 (2011) doi:10.1016/j.tibs.2011.04.001.

93. Skripkin, E., Paillart, J. C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4945–4949 (1994).

94. Sakuragi, J., Iwamoto, A. & Shioda, T. Dissociation of Genome Dimerization from Packaging Functions and Virion Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **76**, 959–967 (2002).

95. Sakuragi, J., Shioda, T. & Panganiban, A. T. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in Virions. *J. Virol.* **75**, 2557–2565 (2001).

96. Ding, P. *et al.* Identification of the initial nucleocapsid recognition element in the HIV-1 RNA packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 17737–17746 (2020).

97. Amarasinghe, G. K., De Guzman, R. N., Turner, R. B. & Summers, M. F. NMR Structure of Stem-loop SL2 of the HIV-1 Psi RNA Packaging Signal Reveals a Novel A-U-A Base-triple Platform. *J. Mol. Biol.* (2000) doi:10.1006/jmbi.2000.3710.

98. Lever, A. M. L. HIV-1 RNA Packaging. in *Advances in Pharmacology* vol. 55 1–32 (Elsevier, 2007).

99. Kaye, J. F., Richardson, J. H. & Lever, A. M. cis-acting sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 RNA packaging. *J. Virol.* **69**, 6588–6592 (1995).

100. Kutluay, S. B. *et al.* Global Changes in the RNA Binding Specificity of HIV-1 Gag Regulate Virion Genesis. *Cell* **159**, 1096–1109 (2014).

101. Monette, A. *et al.* Pan-retroviral Nucleocapsid-Mediated Phase Separation Regulates Genomic RNA Positioning and Trafficking. *Cell Rep.* **31**, 107520 (2020).

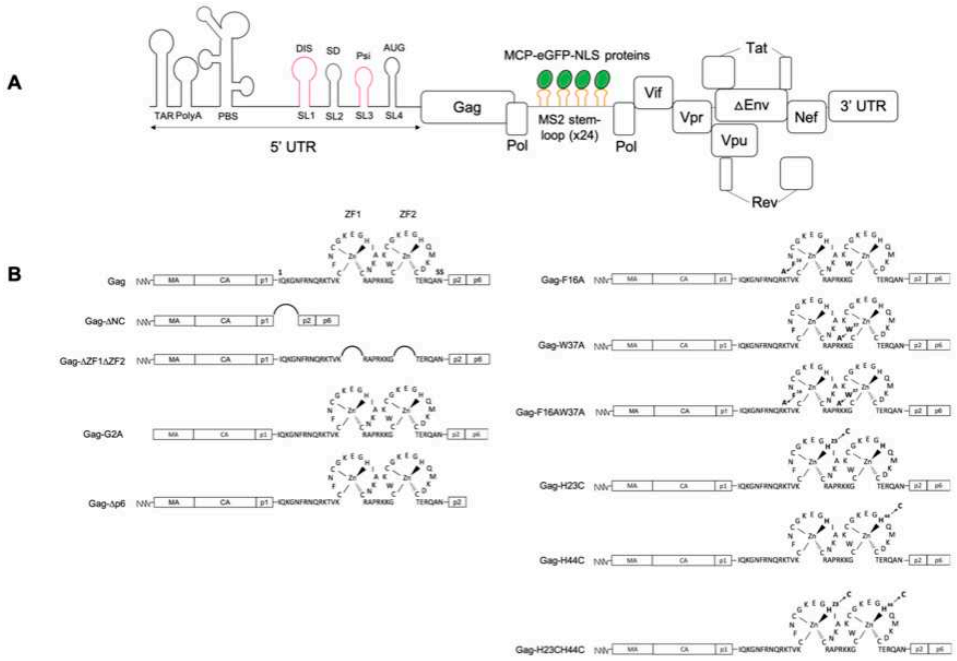
Table 1. Analysis of HIV-1 Gag-gRNA clusters and gRNA packaging

	Mean distance between Gag and gRNA (nm)	WT vs mutant p value	Percentage of virus containing the gRNA
Gag-WT 12h	81.2 ± 29.7	/	No viruses
Gag-WT 24h	61.4 ± 20.2	/	25
Gag-WT 48h	58.4 ± 20.5	/	40
Gag-ΔNC	93.9 ± 29.6	***	Viruses without gRNA
Gag-ΔZF1ΔZF2	105.4 ± 35.2	***	Viruses without gRNA
Gag-F16A	78.4 ± 32.9	**	18
Gag-W37A	98.2 ± 37.6	***	9
Gag-F16AW37A	90.0 ± 37.1	***	14
Gag-H23C	85.3 ± 35.4	***	22
Gag-H44C	85.9 ± 37.2	***	14
Gag-H23CH44C	83.3 ± 35.0	***	Few viruses or retained at PM
Gag-G2A	51.7 ± 21.5	*	No virus
Gag-Δp6	72.8 ± 26.3	*	No virus
gRNA-ΔSL1	61.8 ± 27.1	ns	36
gRNA-ΔSL1ΔSL3	112.7 ± 39.0	***	16

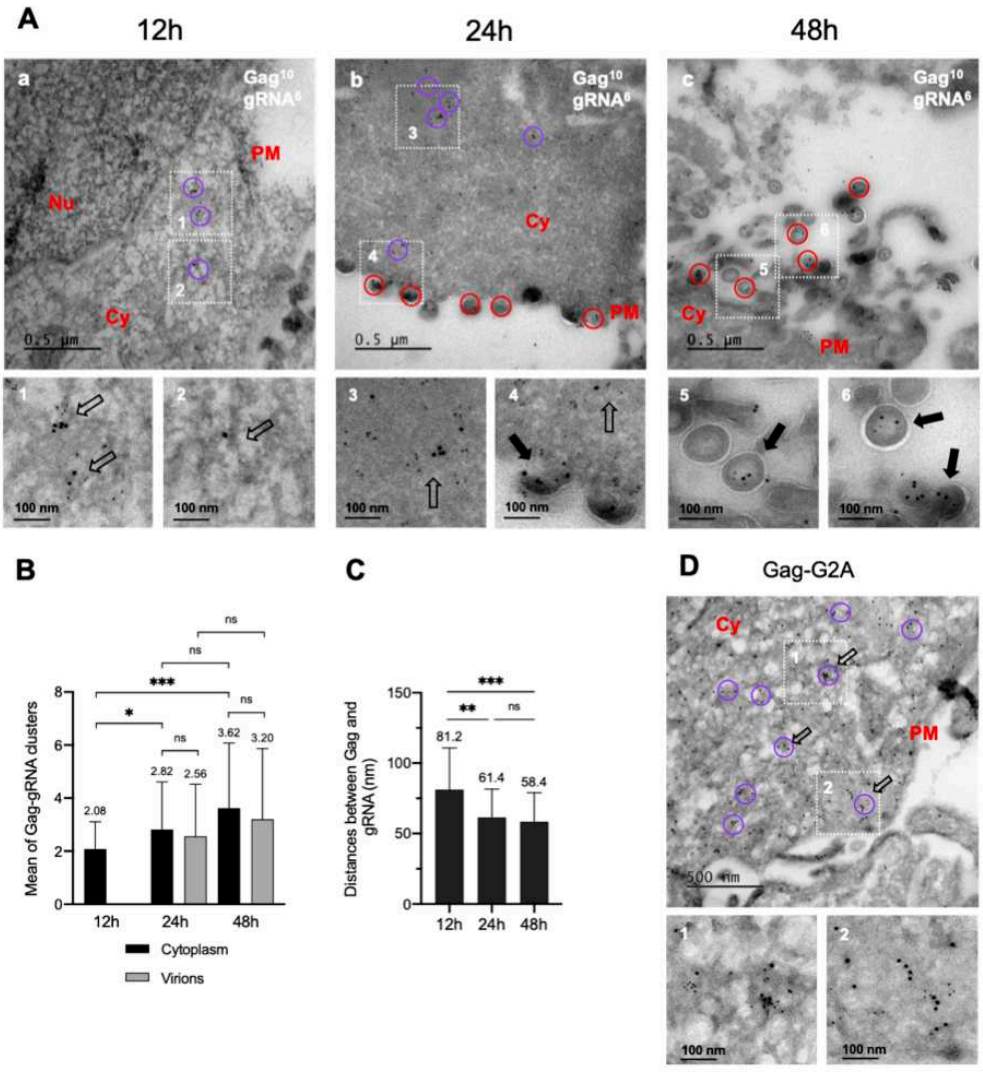
Electron microscopy images of HeLa cells presented in figures 2, 3 and 4 were used to monitor distances between Gag and gRNA. Table shows the mean distances measured in different ROI between each 10 nm gold bead and the surrounding 6 nm gold bead, corresponding to Gag and gRNA respectively. Table also indicates the percentage of gRNA present in viruses for each condition. The data were obtained from the analysis of thirty and fifty electron micrographs for each analysis respectively, obtained from three independent experiments. Results were statistically analysed by Mann-Whitney tests (ns: not significate; * : $p < 0.1$; ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$).

Figures

Fig. 1



905 Fig. 2



906

907

908

909

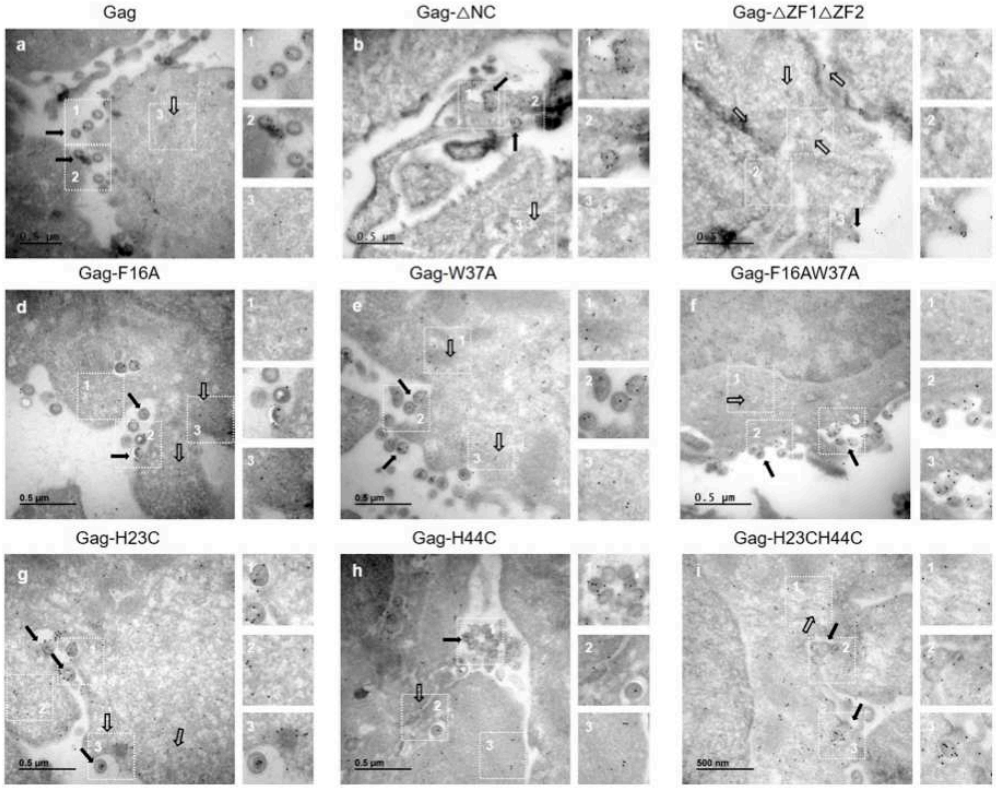
910

911

912

913

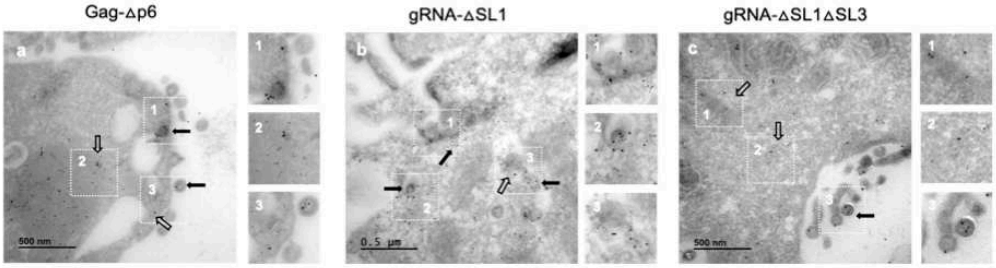
914 Fig. 3



915

916

917 Fig. 4



918

919

920

921

Annexe 2

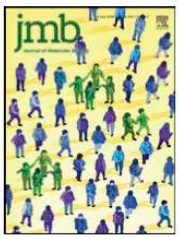
Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context

Running title: HBV capsid assembly in mammalian cells

Virgile Rat[1,†], Xavier Pinson[5,†], Florian Seigneuret[1,†], Stéphanie Durand[1], Charline Herrscher[1], Roxane Lemoine[3], Julien Burlaud-Gaillard[2], Pierre-Yvan Raynal[2], Christophe Hourioux[1,2], Philippe Roingeard[1,2,]
Marc Tramier[4,5] and Hugues de Rocquigny[1]

Manuscrit publié le 01 mai 2020 dans *Journal of Molecular Biology*

Article



Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context

Virgile Rat[1,†], Xavier Pinson[5,†], Florian Seigneuret[1,†], Stéphanie Durand[1], Charline Herrscher[1], Roxane Lemoine[3], Julien Burlaud-Gaillard[2], Pierre-Yvan Raynal[2], Christophe Hourioux[1,2], Philippe Roingeard[1,2], Marc Tramier[4,5] and Hugues de Rocquigny[1,]

1 - INSERM U1259 MAVIVH, *Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours Cedex 1, France*
2 - Plate-Forme IBiSA des Microscopies, *PPFASB, Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, – France*
3 - Plateforme B Cell Ressources, *EA4245 "Transplantation, Immunologie et Inflammation", Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1, France*
4 - Univ Rennes, *IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes)—UMR CNRS 6290, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000, Rennes F-35000, France*
5 - Microscopy Rennes Imaging Centre, *SFR Biosit, UMS CNRS 3480—US INSERM 018, Université de Rennes, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000 Rennes, France*

Correspondence to Marc Tramier and Hugues de Rocquigny: *Univ Rennes, IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes)—UMR CNRS 6290, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000, Rennes, F-35000, France. virgile.rat@etu.univ-tours.fr, xavier.pinson@univ-rennes1.fr, florian.seigneuret@univ-tours.fr, stephanie.durand@etu.univ-tours.fr, charline.herrscher@etu.univ-tours.fr, rlemoine@univ-tours.fr, julien.gaillard@univ-tours.fr, raynal@univ-tours.fr, christophe.hourioux@univ-tours.fr, philippe.roingeard@univ-tours.fr, marc.tramier@univ-rennes1.fr, hderocquigny@univ-tours.fr*
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.026
Edited by M.F. Summers

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) core protein (HBc) is essential to the formation of the HBV capsid. HBc contains two domains: the N-terminal domain corresponding to residues 1–140 essential to form the icosahedral shell and the C-terminal domain corresponding to a basic and phosphorylated peptide, and required for DNA replication. The role of these two domains for HBV capsid assembly was essentially studied *in vitro* with HBc purified from mammalian or non-mammalian cell lysates, but their respective role in living cells remains to be clarified. We therefore investigated the assembly of the HBV capsid in Huh7 cells by combining fluorescence lifetime imaging microscopy/Förster's resonance energy transfer, fluorescence correlation spectroscopy and transmission electron microscopy approaches. We found that wild-type HBc forms oligomers early after transfection and at a sub-micromolar concentration. These oligomers are homogeneously diffused throughout the cell. We quantified a stoichiometry ranging from ~170 to ~230 HBc proteins per oligomer, consistent with the visualization of eGFP-containingHBV capsid shaped as native capsid particles by transmission electron microscopy. In contrast, no assembly was observed when HBc–N-terminal domain was expressed. This highlights the essential role of the C-terminal domain to form capsid in mammalian cells. Deletion of either the third helix or of the 124–135 residues of HBc had a dramatic impact on the assembly of the HBV capsid, inducing the formation of mis-assembled oligomers and monomers, respectively. This study shows that our approach using fluorescent derivatives of HBc is an innovative method to investigate HBV capsid formation.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

There are approximately 250 million people chronically infected with the hepatitis B virus (HBV) worldwide, and among them, nearly 900,000 die annually, primarily as a result of clinical complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. HBV is a 42-nm diameter hepatotropic DNA virus, with an outer envelope made by lipid-embedded small (S), middle (M) and large (L) surface proteins sheltering a 30-nm diameter icosahedral capsid [2]. This capsid corresponds to the oligomerization of the core protein (HBc) and it is filled with a partially double stranded DNA referred to as "relaxed circular" DNA (rcDNA), originating from the reverse transcription of the pregenomicRNA (pgRNA) [3,4]. In addition to these so called DANE particles [5], various studies have shown that the secreted particles have a differential composition. They correspond either to subviral particles made only of envelope proteins, to empty particles or to particles containing pgRNA [6–8].

HBV capsid shell was studied using different production sources to demonstrate that HBc is sufficient for capsid assembly (Table 1). HBc contains 183 residues and is composed of two major domains (Figure 1(a)). The N-terminal domain (NTD) is constituted by residues 1–140 and is essential for the self-assembly of the particle *in vitro* [3] (Table 1). The C-terminal domain (CTD; residues 149–183) contains a series of four arginine-rich domains (ARD), and all the seven potent phosphoacceptor sites that are both essential for pgRNA encapsidation and DNA synthesis [9,18,21–23]. This domain was originally localized in the internal layer of the capsid, but it can also protrude at the surface. Its presence at the surface was shown to depend on the presence or the absence of RNA or DNA, and on its phosphorylation status [10,24–28]. Lastly, HBc contains a small and flexible spacer peptide (141–149), tethering the NTD and CTD domains and possibly regulating capsid assembly [29,30].

In addition to the formation of the capsid, a significant number of studies indicate that HBc has pleiotropic functions in HBV cycle. These functions include nucleic acid (NA) chaperone activity during reverse transcription [23,31], nuclear import of the genome [32] and the interaction with the covalently closed circular cccDNA [4]. Thus, the HBc protein represents a critical factor in virus replication, and a prominent target in developing strategies for new anti-viral molecules [33].

Details on the NTD structure were obtained by X-ray at a resolution of 3.3 Å [19] and by cryoEM [20,34–36]. More recently, the structure of HBc was entirely solved by cryoEM at a 2.6 to 2.8-Å resolution, and it showed that the structure of the NTD domain remains largely unchanged in the entire protein [10]. It forms icosahedral shells containing either 120 HBc dimers (T = 4 particles, 95%) or 90 HBc dimers (T = 3 particles, 5%), arranged in both cases with quasi-equivalence [20]. For T = 4, four similar conformations yield two conformers of HBc dimers, each one forming the characteristic four-helix bundles that appear as spikes on the surface of the capsid [18,19,37]. This four-helix bundle corresponds to the association of two α helices (H3 and H4) of each monomer. This interaction is mainly stabilized by an extensive amount of contacts between the H3 residues. These dimers are assembled in capsids *via* the multiple interactions of residues located in the fifth helical structure, the proline-rich loop (128–136), and the C-terminal arm [19].

The data pointing out the essential role of NTD in the formation of a capsid morphologically similar to capsids formed by a full-length HBc were carried out *in vitro*, using approaches as high salt concentration and proteins purified from *Escherichia coli* (Table 1) [3,20,38]. Nevertheless, the NTD alone failed to assemble properly when purified from rabbit reticulocyte lysates, suggesting that the CTD was also required [12]. Thus, the purpose of our study was to visualize the assembly of the HBV capsid in more relevant cells, and in physiological conditions. We therefore imaged HBc capsid assembly over time by combining fluorescence lifetime imaging microscopy–fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET), fluorescent correlation spectroscopy (FCS) and transmission electron microscopy (TEM). These techniques were performed on human hepatoma cell lines Huh7 permissive for HBV replication [39] and transiently transfected by plasmid expressing HBc, together with HBc derivatives harboring a fluorescent reporter at position 79–81 (Figure 1(a)) [40–42]. FLIM-FRET and FCS analyses revealed that HBc/HBc-eGFP together with HBc-mCherry formed oligomers homogeneously distributed in the cell. Brightness analyses allowed to calculate

Table 1. HBc and HBc-NTD assembly from various organism

	E. coli	Rabbit reticulocyte lysate (RRL)	*Xenopus* oocytes	HepG2.117, HuH7,	Insect cells
HBc	+++ [9–11]	+++ [12]	+++ [13,14]	+++ [10,15,16]	+++ [17]
HBc-NTD	+++ [3,18–20]	– [12]	nd	nd	nd

+++ means assembly efficiency; – means assembly deficiency.

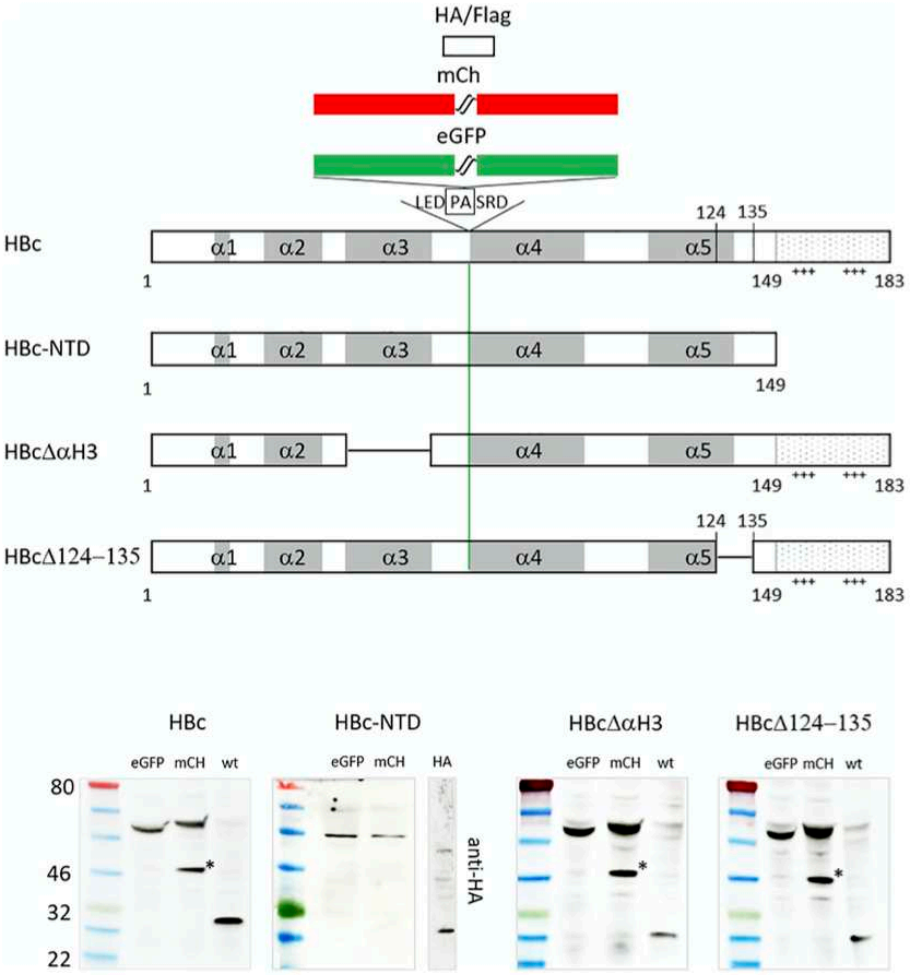


Figure 1. Scheme of HBc and HBc fusion constructs and Western blot analysis. (a) Schematic representation of HBc and HBc derivatives. Gray filled boxes correspond to NTD helical domains and dotted box to the CTD. HA/Flag tags or fluorescent reporters mCherry or eGFP were inserted in the positions 78 and 80. (b) Western blot analysis of HBc and HBc derivatives. Huh7 were transfected with a plasmid expressing HBc or HBc derivatives and harvested 24 h post-transfection. Proteins were heat denatured and loaded on a SDS-PAGE. HBc and HBc derivatives were revealed using anti-HBc antibody excepted for HBc-NTD-HA/Flag that was revealed with an anti-HA antibody. * corresponds to a partial hydrolysis of HBc-mCherry and HBc-mCherry derivatives.

the stoichiometry of HBc in oligomers and an apparent K_d. Using electron microscopy, we observed that these oligomers corresponded to capsid particles. We next used these approaches to detail which HBc sub-domains are required for its assembly in mammalian cell context. We discovered that HBc-NTD fails to self-assemble, suggesting that the CTD is essential for the formation of wild-type capsids in a mammalian cell context. The third helix found essential for monomer-monomer interaction was removed in HBcΔαH3, and this deletion gave rise to monomeric HBc or misassembled aggregates. At least, the ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} sequence required for dimer oligomerization was deleted and HBcΔ124–135 proteins were found diffusing mainly as monomers. Together, our results show that our microscopy methods can be used to track the

assembly of the HBV capsid in a cellular context. This opens the way to the possibility of following the assembly of the HBV capsid during the replication cycle, and the effect of assembly inhibitors such as capsid assembly modulator (CAMs) on the viral capsid structure.

Results

Rational design of HBc and HBc fluorescent proteins to monitor HBc oligomerization

In order to study HBc oligomerization by quantitative fluorescent microscopy, we designed HBc proteins fused to eGFP and mCherry. To this end, several strategies have already been described [43,44], and the insertion of antigens in the c/e1 epitope was shown to poorly impact the capsid formation [45,46]. Indeed, an eGFP protein (or a monomeric mCherry) flanked by glycine-rich linkers was inserted between residues 78 and 80 of HBc and electron microscopy revealed the formation of capsid-like particles of HBc149-eGFP, with surface-exposed eGFP domains [40,42,47,48].

The plasmids encoding unlabeled and labeled HBc were constructed as described in the Materials and Methods section. Western blot analyses of HBc, HBc-eGFP and HBc-mCherry using an anti-HBc antibody revealed the expression of each protein at the expected molecular weight (Figure 1(b), panel 1). Next, we constructed plasmids coding for proteins deleted either from residues 51–71 and encompassing the third helix (HBcΔαH3), or from ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} (HBcΔ124–135) [19]. We then analyzed the expression of HBcΔαH3 (Figure 1(b), panel 3) and HBcΔ124–135 (Figure 1(b), panel 4) and their respective fluorescent counterparts, and found that these proteins localized at their expected molecular weights. However, an additional band was observed for all mCherry derivatives, potentially suggesting a partial hydrolysis of these chimeric proteins.

Using the same strategy, we constructed plasmids expressing HBc-NTD, HBc-NTD-eGFP and HBc-NTD-mCherry. The two fluorescent proteins were detected at their expected molecular weights using an anti-HBc antibody (Figure 1 (b), panel 2), in contrast to non-fluorescentNTD that was undetectable by Western blot and by immunofluorescence (data not shown) and in agreement with recent reports [12,49]. Given that the anti-HBc antibody detected HBc-NTD-eGFP (Figure 1(b)), we hypothesized that the insertion of a sequence in the c/e1 epitope could stabilize HBc-NTD. Hence, a HA/Flag tag was inserted in the apical loop of HBc, allowing the detection of HBc-NTD-HA/Flag with an anti-HA antibody (Figure 1(b)). We now refer to HBc-NTD-HA/Flag as HBc-NTD for the rest of the manuscript.

Co-localization between HBc (or HBc derivatives) with their fluorescent counterpart

To verify the influence of eGFP on the cellular distribution of HBc and HBc derivatives, Huh7 cells were first transiently transfected for 24 h with a plasmid expressing unlabeled HBc or truncated HBc proteins. After fixation, cells were incubated with a human anti-HBc antibody, then with a fluorescent anti-human antibody coupled to Alexa 585 and finally observed by confocal microscopy (Figure 2, upper panels).Wild-type HBc and truncated HBc were diffusing the all cell and predominantly in the nucleus for HBc, HBc-ΔαH3 and HBc-Δ124–135 (Figure 2(a)–(d)), in agreement with the localization of HBc when it is expressed alone [50,51]. We next transfected Huh7 cells with a combination of plasmids expressing unlabeled and eGFP-labeled HBc derivatives (Figure 2, lower panels). This combination of plasmids contained 0.7 μg of plasmid coding for unlabeled HBc and 0.3 μg of plasmid coding for eGFP-labeled HBc, to attenuate the impact of eGFP on HBc assembly according to a previously reported strategy [43,52,53]. Nuclei were stained with DAPI, and proteins were localized through the eGFP fluorescence. As shown in the lower panels of Figure 2, cells that expressed HBc with HBc-eGFP, and all HBc derivatives together with their fluorescent counterparts accumulated predominantly in the nucleus, along with a diffused fluorescence in the cytoplasm. Note that the distribution of HBc-eGFP (Figure 2(c)) was in contrast with the pattern observed in an earlier report using an assembly-incompetent fluorescent HBc with a tandem-repeat of eGFP at the N terminus of core protein [43]. All together, these results show that the cellular localization of HBc or HBc truncated proteins is similar with or without eGFP, suggesting the limited impact of eGFP on the cellular distribution of HBc.

Imaging HBc oligomerization monitored by FLIM in cells

To follow HBc oligomerization, we used the FLIM method to monitor FRET between eGFP and mCherry-labeled HBc [54]. These two fluorescent proteins are commonly used as a donor/acceptor pair to monitor protein/protein interactions by FLIM-basedFRET [55,56]. The donor eGFP has a high quantum yield (0.8) and a mono-exponential time-resolved fluorescence decay [57]. The acceptor mCherry has an absorption spectrum that overlaps the fluorescence spectrum of eGFP, giving a large Förster R_0 distance (where the transfer efficiency is 50%) of about 54 Å [58]. In FLIM-basedFRET, the donor lifetime varies based on the surrounding nanoenvironment, and it can be measured pixel per pixel. The

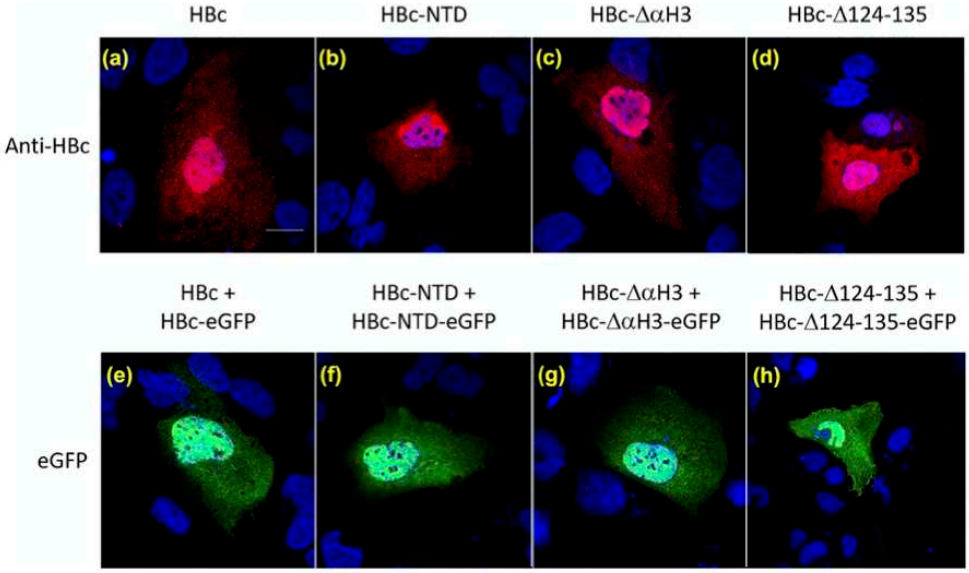


Figure 2. Cellular localization of HBc, HBc derivatives and their fluorescent counterparts. Upper row: Huh7 was transfected with 1 μg of plasmid expressing HBc or HBc derivatives: (a) HBc, (b) HBc-NTD, (c) HBc-ΔαH3 and (d) HBc-Δ124–135. Cells were fixed and immunostained with a human anti-HBc antibody detected with Alexa 585 goat anti-human. The last washing was carried out with DAPI. Lower row: Huh7 was transfected with 1 μg of plasmid expressing HBc or HBc derivatives together with their eGFP counterpart (ratio 0.7/0.3): (e) HBc and HBc-eGFP, (f) HBc-NTD and HBc-eGFP-NTD, (g) HBc-ΔαH3 and HBc-eGFP-ΔαH3, (h) HBc-Δ124–135 and HBc-eGFP-Δ124–135. Cells were fixed and stained with DAPI. Each image corresponds to the superimposition of the blue channel and the green channel. These images show the major observed phenotype from 5 to 10 cells of three independent experiments. Scale bar in white represents 10 μm.

presence of an acceptor in the immediate vicinity of the donor fluorophore allows a transfer of energy between donor and acceptor, shortening the fluorescence lifetime of the donor eGFP. The FLIM technique determines the fluorescence lifetime (τ) of the donor, and τ values can be imaged using a pseudocolor scale.

First, Huh7 cells were transfected with a plasmid expressing eGFP or the tandem eGFP-mCherry, and analyzed 24 h post-transfection. The use of a fluorescent tandem was used to estimate the FRET efficiency in this cellular model. The fluorescence lifetime of eGFP was 2.5 ± 0.01 ns, while the fluorescence lifetime of eGFP tethered to mCherry dropped to 2.23 ± 0.04 ns. Using Eq. (1) described in the Materials and Methods section, this drop in τ corresponded to a FRET efficiency of 11.7% ± 2%, in agreement with an earlier report [59]. FLIM images were built using an arbitrary color scale ranging from 1 ns (orange) to 2.6 ns (red). Cells expressing eGFP (τ = 2.5 ± 0.01 ns) appeared then in blue (Figure 3(a)), and cells expressing the eGFP-mCherry tandem (τ = 2.23 ± 0.04 ns) appeared in red (Figure 3(b)). The color was homogeneously distributed throughout the cell, in agreement with the diffused localization of these reporter proteins [60]. FLIM analyses of cells expressing eGFP and eGFP-mCherry was also carried out at 48–72 h post-transfection, without significant modifications of eGFP τ (data not shown).

We next calculated the fluorescence lifetime of eGFP fused to HBc in cells transfected by a combination of plasmids expressing HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) at 24 h post-transfection. When compared to eGFP alone, eGFP lifetime was lowered in the presence of HBc (2.06 ± 0.04 ns) (Figure 3(c)). Image rendering of this drop corresponded to a pseudocolored dark blue cell (compare Figure 3(a) and (c)), showing that eGFP lifetime was modified by its fusion to the HBc protein. This control was also performed at 48 and 72 h, without any significant modification in the lifetime of HBc-eGFP at this timepoints (data not shown). HBc-eGFP lifetime values at 48 and 72 h were used to calculate the FRET efficiency as function of time post-transfection (Figure 4). Compared to eGFP

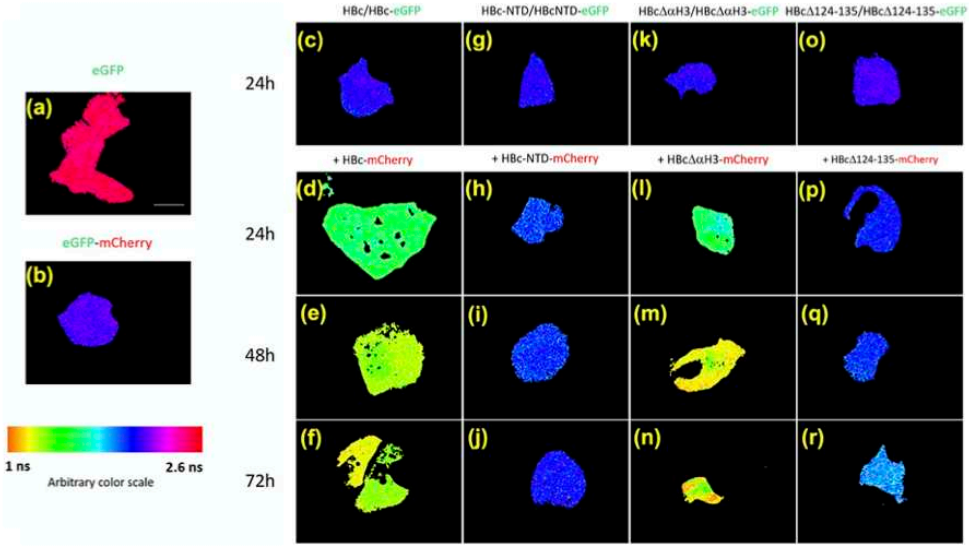


Figure 3. Imaging the oligomerization of HBc and HBc derivatives. Representative lifetime images showing the distribution of HBc-eGFP (and HBc-eGFP derivatives) proteins expressed in Huh7 cells. Cells were transfected by a plasmid expressing eGFP (a) or the chimeric eGFP-mCherry protein (b) or a mixture of HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) (c) together with HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (d, e, f) or a mixture of HBc-NTD/HBc-eGFP-NTD (ratio 0.7/0.3) (g) together with HBc-NTD-mCherry (ratio, 0.7/0.1/0.2) (h, i, j) or a mixture of HBc-ΔαH3/HBc-ΔαH3-eGFP (ratio 0.7/0.3) (k) together with HBc-ΔαH3-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (l, m, n) or a mixture of HBc-Δ124–135/HBc-Δ124–135-eGFP (ratio 0.7/0.3) (o) together with HBc-Δ124–135-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (p, q, r). Three 24-well plates were prepared with 810^5 cells/well, incubated 37 °C for 24, 48 or 72 h. Then, DMEM medium was substituted for phenol red-free Leibovitz's L-15 medium supplemented with 20% FBS and observed in thermostatic chamber. The fluorescence lifetime τ of HBc-eGFP (or HBc-eGFP derivatives) was measured in the absence of the acceptor protein (images c, g, k and o) or in the presence of their mCherry counter parts and converted into color using a color scale ranging from orange (1 ns = short fluorescence lifetime) to red (2.6 ns = long fluorescence lifetime). A scale bar in white is reported image a and represents 10 μm.

alone, the shorter lifetime of eGFP when fused to HBc could originate from a misfolded eGFP protein. This was further suggested by the twofold decrease of the extinction coefficient calculated on Core 1–149 containing an internal eGFP [40].

Then, cells transfected by a mixture of plasmids expressing HBc/HBc-eGFP/HBc-mCherry (ratio, 0.7/0.1/0.2) were imaged at 24, 48 and 72 h post-transfection to monitor HBc oligomerization in function of time. At 24 h post-transfection, the eGFP mean lifetime dropped to 1.51 ± 0.03 ns and remained stable over time (1.46 ± 0.04 ns at 48 h and 1.41 ± 0.05 ns at 72 h) giving rise to cells pseudocolored yellow (Figure 3(d)–(f)). Using Eq. 1, we calculated an average FRET efficiency of 28 to 30% at 24, 48 and 72 h (Figure 4, yellow rectangles). This strong FRET efficiency showed that HBc molecules are closely packed, allowing a close proximity between the eGFP and mCherry tags. The absence of FRET variation in function of time suggested that HBc oligomers were probably formed along or just after the translation process.

The impact of the HBc CTD on the assembly of HBc was assessed using the same strategy. As mentioned above, the absence of unlabeled HBc-NTD expression [49] prompted us to analyze cells expressing a mixture of HBc-NTD containing an HA/Flag tags together with the HBc-NTD-eGFP and HBc-NTD-mCherry counterparts. In cells expressing HBc-NTD/HBc-NTD-eGFP (ratio 0.7/0.3), the eGFP mean lifetime was of 2.14 ± 0.01 ns (Figure 3 (g)), and the co-expression of these proteins with HBc-NTD-mCherry gave a mean τ equal to 2.05 ± 0.03 ns. Consistent with this slight decrease of τ, cells were pseudocolored in dark blue (Figure 3(h)). This weak variation of lifetime was not dependent on the time of protein expression, as the eGFP mean lifetime calculated at 48 and 72 h post-transfection were of 2.03 ± 0.04 and 2.12 ± 0.05 ns, respectively, thus leading to cells pseudocolored in light blue (Figure 3(i) and (j)) and a FRET efficiency of ~3–5% (Figure 4, dark blue boxes). This low FRET efficiency indicated that HBc-NTD proteins weakly condense, but they could diffuse as monomers/

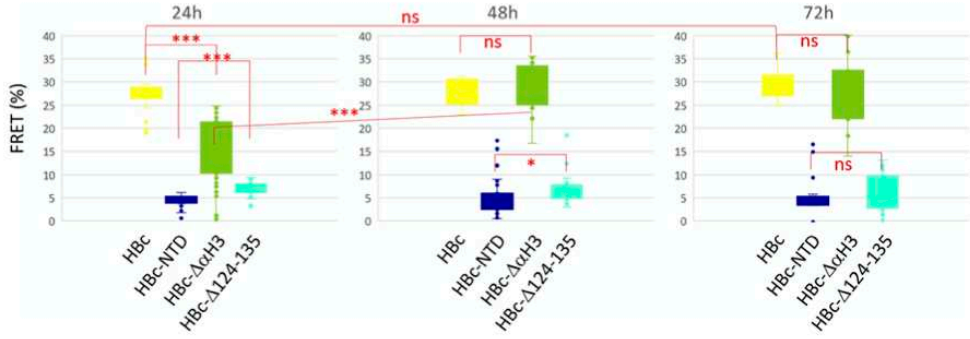


Figure 4. Histograms of FRET efficiency as function of time post-transfection. Box and whiskers plots of the FRET efficiency (*E*) was determined at 24, 48 and 72 h post-transfection. *E* was calculated using Eq. (1), where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor. Of note, τ_D used in the equation was determined for each HBc derivatives and at time of FLIM analysis (24 h, 48 and 72 h). Student tests were performed to compare the FRET efficiencies for at least 150 cells in three independent (ns: not specific; $^*p < .05$; $^{***}p < 10^{-3}$).

dimers in Huh7 cells. Alternatively, they could oligomerize in a non-canonicalpseudo-capsid shell, avoiding the close proximity between the two fluorescent reporters.

We then investigated the role of HBc structure on the oligomerization of the protein. Helix 3 was described as a long helical hairpin involved in the dimerization of each HBc monomer, and with the (124–135) stretch consisting on the bottom of the fifth helix and the following proline-rich sequence in interaction between dimer subunits [19]. Deletion of the third helix showed a heterogenous decrease of the mean lifetime at 24 h post-transfection (1.85 ± 0.15 ns) with two populations of cells, pseudocolored blue (not shown) and green (Figure 3(l)). This heterogeneity of τ was translated in a large FRET distribution ranging from 0 to a FRET similar to the wild-typeFRET level (Figure 4, green box). Interestingly, HBc-ΔαH3-eGFP lifetime decreased to 1.5 ± 0.14 ns as function of time post-transfection, leading to cells pseudocolored orange/yellow (Figure 3 (m) and (n)). After 72 h post-transfection, τ was not statistically different from the lifetime obtained with wild-type HBc (Figure 4, green bars). These results indicated a compaction of HBc-ΔαH3 oligomers with time, and/or an increase in the oligomer size so that the number of acceptor molecules in close proximity of each donor molecule would increases.

The deletion of (124–135) peptide had a more profound effect on HBc oligomerization since τ remained stable at 2–2.1 ns, leading to cells pseudocolored blue (Figure 3(p)). In contrast to HBc-ΔαH3, the time of protein expression up to 72 h had only a slight effect on HBc-Δ(124–135)-eGFP lifetime with apparition of cells pseudocolored light blue (Figure 3(q) and (r)) without a clear increase of the FRET mean efficiency (Figure 4, light blue boxes).

Taken together, our data indicate that HBc forms oligomers in the cytoplasm and the nucleus. The homogeneous spatio-temporal distribution of τ suggests that HBc oligomerization is neither restricted to a specific cytoplasmic domain nor to the time of expression (i.e. protein concentration). This oligomerization requires both the C terminus and the (124–135) sequence, while the kinetics of HBc oligomerization depends on the third helix.

HBc oligomerization monitored by Photo Counting Histogram analysis

To further characterize the oligomerization of HBc, FCS was performed on cell expressing HBc or HBc derivatives together with their fluorescent counterparts. This technique relies on the measurements of the intensity fluctuations of fluorescent species within a femtoliter volume to determine their physical parameters—diffusion time, local concentration and molecular brightness, which are related to their hydrodynamic and photophysical properties [61].

Fluorescence fluctuation measurements of eGFP fluorescence were acquired in the confocal volume during 30 s in live cells expressing HBc, HBc-NTD, HBcΔαH3 or HBcΔ124–135, together with their fluorescent counterparts. As mentioned for FLIM, the ratio of unlabeled to labeled plasmid was 0.7/0.3 to avoid the steric hindrance of the labeled eGFP during the core particle formation. Representative time traces of the photon counts were presented in Figure 5(a)–(d) for each condition. Measurements with wild-type HBc showed fluctuations with a much larger amplitude relative to the mean than with the HBc-NTD or the HBcΔ124–135 proteins (compare upper panels of Figure 5(a) with Figure 5(b) and (d)). This was in agreement with the expected presence for HBc of

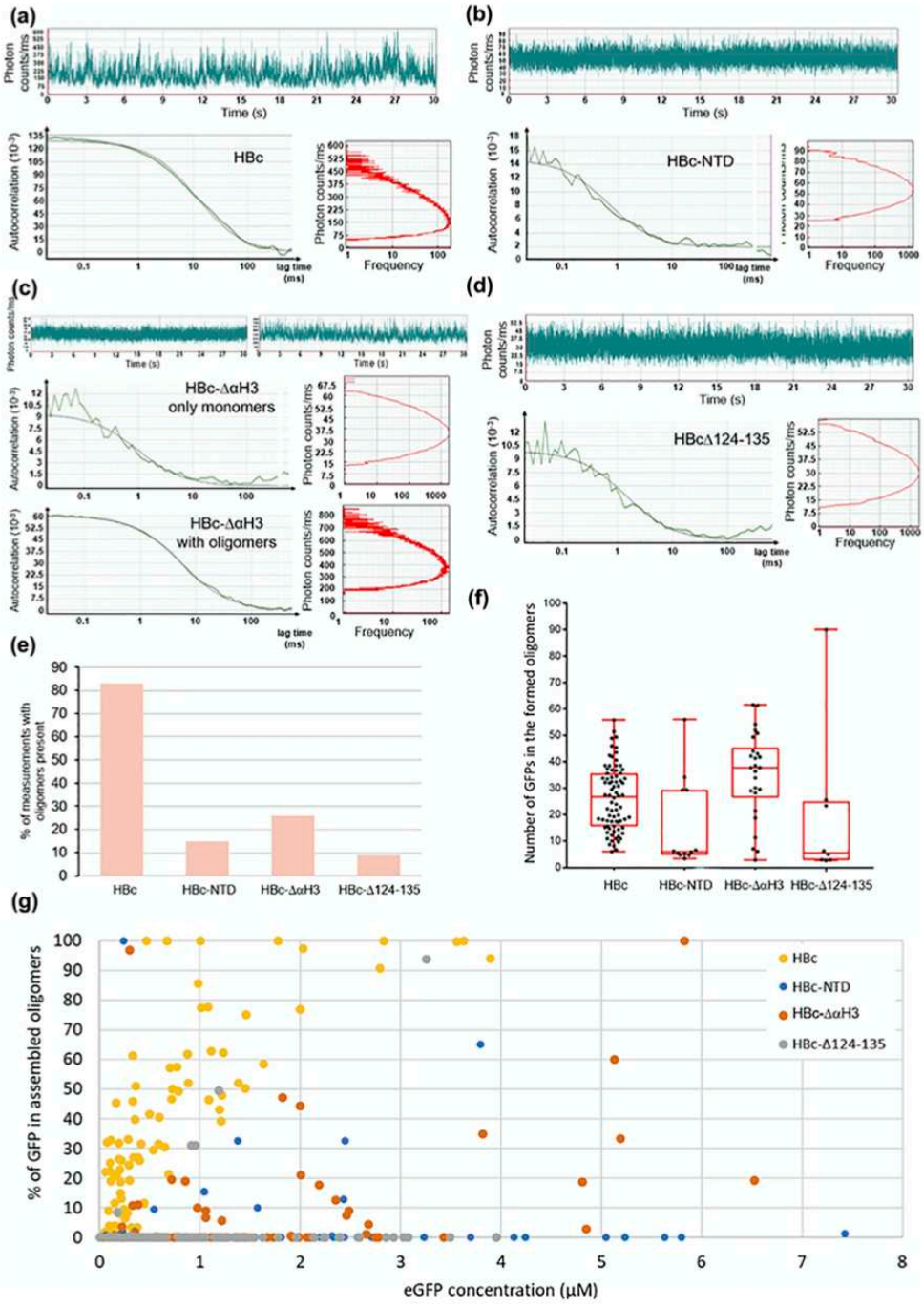


Figure 5 (*legend on next page*)

oligomers as bigger and brighter particles going in and out the confocal volume, and causing larger fluctuations. In the case of HBcΔαH3, two different fluctuations were observed, potentially indicating the presence of either oligomers or monomers (Figure 5 (c)). A conventional autocorrelation curve obtained after the temporal auto-convolution of this time trace was also presented with a typical single species Brownian motion fit. Independently of the different measurements, fits of the autocorrelation curves always exhibited a single species model. This was also true for potentially mixed populations of monomers and oligomers (see Figure 5(c)). The approach using autocorrelation analyses thus presented contrasted results with fluorescent proteins either diffusing with a fast residence time (around 300 µs, Figure 5 (d)–(d)), characteristic of what was found for the monomeric eGFP expressed in live cells [62], or diffusing with a residence time more than 10-time longer (around 10 ms Figure 5(a) and (c)), representative of eGFP oligomerized into a constituted core oligomer. With this analytic approach, we did not succeed in characterizing a mixed population with a double species model after fitting. This is directly related to the way of HBc forms particles, with a potential mixture of fast diffusing monomers having the single eGFP brightness and of slow diffusing oligomers, and with eGFP more than 10-fold brighter.

To finely analyze the formation of core particle oligomers from monomers, we decided to turn to the Photon Counting Histogram method (PCH) [63]. PCH gives access to the brightness of a fluorescent species and the number of fluorescent particles in the detection volume. In contrast with conventional autocorrelation that distinguish species with different diffusion times, the PCH approach allows to distinguish species of different brightness value. Thus, it is a very powerful method when the molecular mixture to analyze is constituted of species with different brightness. Experimental PCH curves were directly obtained from the time trace and plotted in Figure 5(a)–(d) (red curves). Contrary to the autocorrelation curves, the analysis of these PCH curves allowed to distinguish monomers from oligomers, thereby opening up the possibility of quantifying the ratio between monomers and oligomers in the living cell. All FCS measurements (three measurements per cell, n = 86–105 for each condition) were analyzed by PCH with a two species model: the monomeric species (freely diffusing HBc monomer) with a fixed brightness value *q1* (the brightness obtained with a control measurement on cells expressing monomeric eGFP) and *n1*, which is the mean number of monomers diffusing in the observation volume. Accordingly, the oligomeric species were given a brightness value *q2* and *n2* being the mean number of oligomers diffusing in the observation volume. For some analyzed PCH,*n2* was found close or equal to zero, which corresponds to the absence of oligomeric particles. For each cell analyzed, we then determined if oligomers were present ($n2 \neq 0$) or absent ($n2 = 0$). Figure 5(e) represents the percentage of measurements where the oligomers were present for each condition. When measurements were performed in cells expressing wild-type HBc, oligomers were found in 83% of the cases. On the contrary, the presence of oligomers in cells expressing HBc-NTD or HBcΔ124–135 was found in 15% and 9.2% of the cases, respectively. An intermediate situation was observed for HBcΔαH3, where oligomers were found present in 25.7% of measurements.

When oligomers were present, we are able to determine the size of these oligomeric particles through the quantification of their brightness. We calculated the number of labeled eGFP proteins in the oligomer by calculating the *q2*/*q1* ratio (see Materials and Methods for details) (Figure 5(f)). For wild-type HBc, the median value was 26.4, meaning that the brightness of an assembled core particle is 26.4 times the brightness of monomers (Figure 5(f)). The brightness of the larger species is thus 25–30 times that of the smaller one, assuming that the smaller species is a single-labeled dimer HBc/HBc-eGFP. Previous studies showed that in HBc-NTD-eGFP capsids only about 40–50% of the labeled proteins were fluorescent, thus this brightness should correspond to about 50–70 HBc-eGFP [40]. Further considering the excess of unlabeled to labeled protein resulting from the plasmid ratio (0.7/0.3) used for transfection, the larger species should correspond to an oligomer of 170–230 copies of HBc. This experimental value is in the range of the 180 to 240 copies of HBc protein for T = 4 or T = 3 triangular organizations [36]. Interestingly, the median value for HBcΔαH3 was similar to the value obtained for HBc (Figure 5(f))

Figure 5. Analysis of HBc or HBc derivatives particle formation through fluorescence fluctuation spectroscopy. (a–b–c–d) Single representative measurements of fluorescence fluctuation. Each panel comprises the time trace of the photon counts over the 30 s of the measurement (top), the autocorrelation curve (left) and the photon counting histogram (right) obtained on cells expressing. (a) HBc-HBc-eGFP (ratio 7/3); (b) HBc-NTD-HBc-NTD-eGFP(7/3); (c): HBc-ΔαH3-HBc-ΔαH3-eGFP (7/3); (d): HBcΔ124–153-HBcΔ124–153-eGFP(7/3). (e) Proportion of measurements where the formation of oligomeric particles was observed. (f) Box-plot showing the distribution of the measurements of the number of eGFPs in the observed particles (*q2*/*q1*, see Materials and Methods for details about the calculations). Top and bottom line: first and third quartiles respectively. Middle line: median value. Whiskers: minimum and maximum values. (g) Distribution of the proportion of eGFP found in assembled particles over the concentration of eGFP in the observed confocal volume. See Materials and Methods for calculation details.

showing that the HBcΔαH3 oligomers present in 25.7% of the measurements (Figure 5(e)) contained the same range of fluorescent proteins as the wild-type. In contrast, for both HBc-NTD and HBcΔ124–135, the median value of *q2/q1* ratio was 6.2 and 6.3, respectively. In the few measurements where oligomers were observed (Figure 5(e)), this demonstrates that both mutants generally originated smaller oligomers.

It is believed that HBc first dimerizes, and then it assembles in capsid in the cytoplasm (ref). Unfortunately, with our experimental setup, we were not able to determine if the non-oligomeric form of HBc would be monomeric or dimeric. Indeed, our experimental procedure was to transfect 30% of labeled HBc with 70% of unlabeled ones. If dimers are formed, a large majority would have single-labeled eGFP, indistinguishable from monomers as all exhibited the same brightness.

We finally used the brightness to measure protein binding curve inside the living cell. To this end, we plotted the percentage of eGFP molecules in assembled particles (Eq. 2) as a function of the total concentration of eGFP-fused proteins expressed in the measured cell (Eq. 3) (Figure 5(g)). For cells expressing wild-type HBc (Figure 5(g); yellow dots), most of the measurements showed that this protein was essentially in an oligomeric form, and this even at low protein concentrations. The amount of wild-type HBc for which 50% of the eGFP species were engaged in oligomers was about 0.7–0.8 μM, suggesting that the HBc capsid assembly was obtained at a sub-micromolar concentration. Conversely, in the case of cells expressing HBc-NTD or HBcΔ124–135 (Figure 5 (g), blue and gray dots, respectively), the vast majority of measurements showed the presence of the sole monomeric species, showing that these HBc mutants did not form oligomers. Consistent with the results shown on Figure 5(e) and (f), HBcΔαH3 (Figure 5(g), orange dots) displayed an intermediate situation, with measurements reflecting the presence of both monomeric and oligomeric species, suggesting that this protein retains the ability to form assembled particles at higher proteins concentrations.

Taken together, our FCS data are consistent with our FLIM-FRET experiments. On one hand, high FRET efficiencies obtained for HBc and HBcΔαH3 correspond to the formation of larger oligomers. On the other hand, the low FRET efficiencies obtained for HBc-NTD and HBcΔ124–135 corresponds to the formation of monomers or smaller oligomers. Moreover, we determined that a sub-micro molar concentration of wild-type core protein was sufficient for capsid assembly in living cells. Last, brightness measurements indicate that the larger HBc oligomers are capsid-sized.

Organization of HBc aggregates in cellular context viewed by immuno-electron microscopy

We then sought to determine if the mixture of HBc or HBc derivatives with their fluorescent counterparts were oligomerized in wild-type capsid particles. Cells were transfected with a plasmid expressing HBc together with a plasmid expressing HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3), consistently with the conditions used for FLIM-FRET and FCS. After 24 h of protein expression, cells were sorted by FACS and pellets

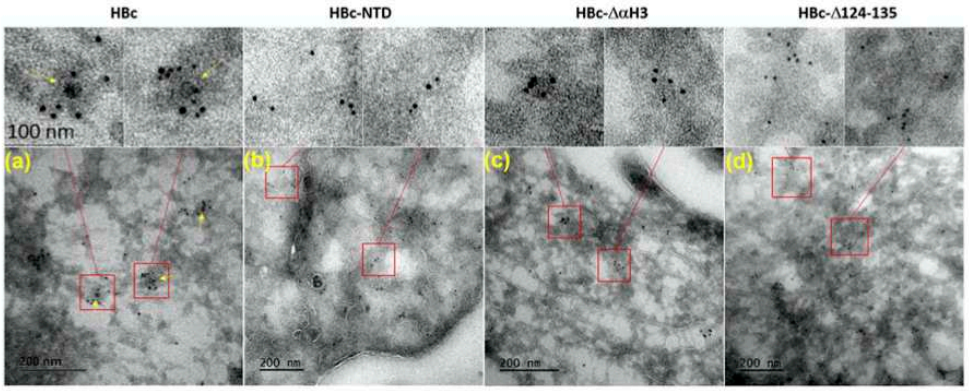


Figure 6. Immunogold labeling of HBc and HBc derivatives by cryo-electron microscopy (Tokuyasu method). Huh7 were transiently transfected by a mixture of DNA plasmid expressing HBc (a) or HBc-NTD (b) or HBc-ΔαH3 (c) or HBc-Δ124–135 (d) together with their eGFP counterpart in a ratio 0.7/0.3. Cells were sorted by monitoring eGFP and fixed prior to gelatin inclusion. Ultrathin sections were cut (70 nm) and incubated first with rabbit anti-eGFP antibody and then with 10-nm size gold-conjugated anti-rabbit antibody. Scale is reported at the bottom left. Insets present various clusters of gold-conjugated goat anti-rabbit. HBV capsids are highlighted by yellow arrows.

were processed for immuno-TEM with a primary anti-eGFP antibody. In cells expressing HBc/HBc-eGFP, we observed 10-nm gold beads, corresponding to the secondary antibody, surrounding a small, spherical and electron dense material (yellow arrows), and its size corresponded to the dimensions of a native capsid (Figure 6(a), enlargements and Figure S1). The distance between the central core and the gold beads corresponded to the dimensions of the primary-secondary antibody pair. These findings indicate that eGFP-labeled HBc was incorporated in HBV capsids in cells. Conversely, cells expressing either HBc-NTD (Figure 6(b)) or HBcΔ124–135 (Figure 6(d)) showed gold beads dispersed throughout the cell, without a notable accumulation into clusters. Finally, regarding the deletion of the third helix with HBc-ΔαH3, we observed clusters of gold beads without the presence of a dense central core (Figure 6(c)). Since Figures 3 and 4 showed an increased FRET efficiency as a function of time post-transfection for this construct, immuno-TEM was repeated at 72 h. However, we did not observe the formation of capsids at this time point (data not shown). Overall, these results provide evidence that only eGFP-labeled HBc forms native-like particles.

Discussion

Within the cell, the degree of HBc oligomerization was never studied. In this work, we investigated HBV capsid assembly in Huh7 hepatoma mammalian cells by combining FLIM-FRET, FCS and TEM. Combination of modern imaging techniques had previously been used to image the assembly of HTLV,RSV or HIV and to quantify the interaction between viral and cellular partners [52,53,64–71]. These approaches provided data that revolutionized our knowledge of the dynamic and structural changes involved during viruses infectious cycle [72–75] as well as in other fields of biology [76].

By using fluorescent protein tags, we show here that HBc/HBc-eGFP forms capsids in Huh7 cells similarly to wild-type capsids (Figures 6 and S1). The FRET efficiency of HBc-eGFP found in our experiments remained similar 24, 48 and 72 h post-transfection. This suggests that the core oligomerization happens shortly after expression and that the oligomers are not more condensed when the protein concentration increases (Figure 3(d)–(f)). This oligomerization observed without major structural changes along the time is consistent with the homogeneous distribution of the particle size found by FCS data (Figure 5(f)). The average brightness of 26.4 times the brightness of a single eGFP corresponds to an average number of HBc per oligomer between 170 and 230 (considering the expression of dark HBc). This average number fits with the quantity of 180 or 240 of HBc units (depending on the T = 4 or T = 3 icosahedral symmetry) found in HBV capsid structure [19,36].

Next, we used brightness analysis of FCS measurements that allows to discriminate monomers from oligomers to measure the assembly binding curve and to determine an apparent K_d for HBV capsid assembly of 0.7–0.8 μM (Figure 5(g)). Interestingly, brightness to measure protein–protein interaction inside living cells was already used to calculate the self-association of nuclear receptors with an apparent K_d of a few μM [77]. Similarly, the concentration of HTLV Gag and HIV Gag forming particles in living cells determined by brightness analysis was ~0.5 μM [78], with a stoichiometry for HIV ranging 750 to 2500 copies of protein per particle. This is in agreement with the larger size of HIV virus compared to HBV [79]. All these results illustrate that the brightness analysis provides details of molecular complexes in cells that would be difficult to obtain with other techniques.

In this work, a high level of HBc was imaged in the nucleus (Figure 2) in contrast to HBc staining in replicative cells [50]. In our condition of HBc expressed alone in Huh7 mammalian cells, HBc-CTD is phosphorylated and HBV capsid free of host nucleic acid with a partial exposure of HBc-CTD on the exterior of the capsid [10,24–26,80–82]. In turn, the NLS comprised in the CTD is available to drive HBc nuclear import [83,84] and, together with a nonspecific, but high affinity of HBc-CTD for double-stranded DNAs [21], to favor HBc accumulation in the nucleus. Our results also show that capsids containing a mixture of unlabeled and labeled HBc form are properly organized and sized (Figure 6(a)) like HBV capsids observed in cells replicating HBV (Figure S1). HBc assembly is so independent from other viral factors or from the maturation of the capsid during the reverse transcription of the pgRNA. In addition, we found by FRET that wild-type HBc efficiently oligomerize (Figures 4 and 5A and (e)) and oligomers are homogeneously distributed within the entire cell (Figure 3). This result shows that the assembly of HBV capsid is not restricted to a cellular sub-compartment, as described for herpes viruses in the nuclear compartment [85] or retroviruses at the plasma membrane [86]. Moreover, no significant difference in FRET efficiency or FCS measurements was observed in the nucleus as compared to the cytoplasm, despite the fact that a structural reorganization of the capsid was proposed for it to enter the nucleus [87]. In fact, in our experiments, the HBc protein was expressed alone, and as a consequence, potential structural reorganizations mediated by HBV maturation or its nuclear entry were not properly occurring [87]. Furthermore, it was proposed that the nuclear import of HBc oligomers is different from the nuclear import of viral particles competent for replication [43].

In contrast to the wild-type HBc, a low FRET efficiency was observed in cell expressing HBc-NTD

indicating a weak, if any, formation of HBc-NTD oligomers (Figures 3 and 4). The low FRET was not due to a reorganization of oligomers with a larger distance between donor and acceptor, since HBc-NTD was indeed essentially observed as monomeric protein by FCS (Figure 5(e)–(g)). This impairment of HBc-NTD to assemble was also confirmed by the absence of spherical, ordered complexes by TEM (Figure 6(b)). This low FRET efficiency (Figure 4) and brightness (Figure 5(f)) for HBc-NTD were constant for all the post-transfection timepoints analyzed, so that the lack of HBc-NTD oligomerization was not rescued by a higher concentration of protein. Indeed, no HBc-NTD oligomerization was found, even with up to 6–7 μM of HBc-NTD labeled protein (Figure 5(g)). Interestingly, labeled HBc-NTD produced in millimolar concentrations in *E. coli* is able to form such capsids [40,42]. Nevertheless, in the more physiological conditions, we used in this work no capsid was detected with labeled HBc-NTD, emphasizing the essential role of the CTD in HBV capsid morphogenesis.

The inefficiency of HBc-NTD to form HBc capsid when purified from a rabbit reticulocyte mammalian cells lysates had previously been reported by the group of Hu *et al.* [12]. Our analysis using quantitative methods confirms and extends this observation. How to explain this important difference between HBc and HBc-NTD assembly in a cell context? It is possible that the absence of HBc-NTD capsid assembly in our condition results from the low concentration of expressed protein, since purified HBc-NTD was shown *in vitro* to assemble with a $K_{dapparent}$ of 15 μM at 0.15 M of NaCl. Alternatively, HBc-NTD assembly cannot take place in cellular conditions due to the lack of CTD. It has long been suspected that the C terminus facilitates the formation of the native shell capsid, probably *via* specific or nonspecific interactions with RNA [12,18,88]. Nevertheless, as aforementioned when HBc is expressed alone in Huh7 mammalian cells, the CTD is phosphorylated and HBV capsid frees of host nucleic acid [10,80,82]. Therefore, it is likely that the differences observed between HBc and HBc-NTD are due to a defect in protein–protein interactions mediated by electrostatic interactions, as recently proposed by the group of Nassal [10] and by the use of CTD phosphomimetic 7E mutant [12]. Moreover, it is known that the CTD interacts with the SRPK protein, and it was proposed that, in addition to participating to CTD phosphorylation, SRPK could act as a potent protein chaperone that facilitates HBV capsid assembly [24]. The fact that a viral protein can hijack the cellular chaperone machinery during morphogenesis has been shown for other plant or animal viruses [89].

To further confirm that the quantitative fluorescent microscopy measurements on HBc-eGFP expressed in live cells is an efficient tool to study HBc assembly, we deleted two different domains of the protein to follow its effect on the assembly of the core particle. The third helix, together with the fourth helix, belongs to the α-helical hairpin protruding at the surface of the capsid. HBc dimers are stabilized through close contacts between helix 3 of each monomer, but not with helix 4 [19,90]. When the third helix was removed, we unexpectedly found a high FRET efficiency and the formation of large oligomers. Both FRET efficiency (Figures 3 and 4) and FCS analyses (Figure 5(c) (f)) were sensitive to the concentration of HBc-ΔαH3 proteins. FRET efficiency at 72 h post-transfection is similar to the FRET efficiency of the wild-type protein, except for its distribution exhibiting a large standard deviation and suggesting heterogeneous oligomers. In agreement with this heterogeneity, fluorescent particles with fast or slow diffusion coefficients were observed (Figure 5(c)). Despite these results, we never observed any capsid structure in TEM, but only the clustering of gold beads (Figure 6(c)) up to 72 h post-transfection (data not shown). This ability of HBc-ΔαH3 to oligomerize, although a non-canonical structure (Figure 6(c)), could be explained by the presence of ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} domain, since its deletion in the HBcΔ124–135 constructs has a dramatic impact on HBc oligomerization (Figures 3–6). This sequence contains the end of the fifth helix and the proline-rich loop essential for dimer–dimer interactions [19]. Mutations of R127 to L or Q were shown to clearly affect the *in vitro* assembly of HBc-NTD expressed from *E. coli* [90].

In conclusion, the knowledge gained in these studies provides novel insights to describe the spatio-temporal behavior of the HBc protein. FRET and FCS allowed to follow the assembly of HBc, while TEM allowed the observation of HBV capsids. We found that HBV assembly occurs efficiently at a low protein concentration, regardless of its cellular localization. The loss of the C terminus is detrimental to such assembly and is not rescued by raising the protein concentration. These results are important for the analysis of processes involved in HBc oligomerization such as phosphorylation [8], or the role of host proteins acting as chaperones and regulating the assembly of this viral capsid [24]. Furthermore, these studies could be used to detail the dynamics of CAMs-mediated capsid assembly inhibition and to follow the ultrastructure behavior of these complexes.

Materials and Methods

Plasmid DNA

The pTURF plasmids encoding for HBc and HBc-NTD, subtype ayw, fused to eGFP (also referred below to as fluorescent protein (FP)) was kindly provided by M. Nassal [40]. FP is surrounded by flexible glycine

linkers and inserted in the c/e1 epitope. This internal fusion was shown to be well tolerated with the formation of core particles [36,41,91–93]. HBc-eGFP was introduced in pcDNA3.1 by PCR, and this plasmid was used for the construction of unlabeled HBc and HBc-mCherry. These three plasmids were then used to generate HBc-NTD-HA/Flag, HBc-ΔαH3, HBc-Δ124–135 and their fluorescent counterparts. Primers used for amplification are summarized in Supplemental Table 1. The integrity of all plasmid constructs was assessed by DNA sequencing.

Cell culture and plasmid DNA transfection

Huh7 (differentiated hepatocyte-derived carcinoma cell line) were cultured in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (DMEM + GlutaMAX, Gibco, Lifetech, France) and 1% of an antibiotic mixture (penicillin/streptomycin: Invitrogen Corporation, Pontoise, France) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Huh7 cells were transfected or co-transfected using jetPEI™ (Life Technologies, Saint Aubin, France) according to the supplier's recommendations. To keep a constant amount of transfected DNA, each transfection assay was supplemented with $pcDNA_3$.

Western blot

Twenty-four hours post-transfection, Huh7 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS 1×: 140 mM NaCl, 8 mM NaH_2PO_4, 2 mM Na_2HPO_4), treated with trypsin and resuspended in ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM NaPPi, 1 mM Na3VO4 in PBS supplemented with a complete anti-protease cocktail from Roche, Meylan, France). After centrifugation, total protein concentration was assessed by Bradford analysis (Bio-Rad), and 30 µg of total protein was loaded on a 12% SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto PDVF membrane (Amersham, Orsay, France), and blots were probed with a human anti-HBc polyclonal anti-body (dilution 1:5000) [94] or with anti-HA antibody (AB18181, dilution 1:2000) followed by horseradish peroxidase conjugated rat anti-human (Southern Biotech, dilution 1:20000) or rat anti-mouse (Southern Biotech, dilution 1:10000), revealed by chemiluminescent ECL Prime system on a Imagequant LAS500 apparatus (GE Healthcare).

Confocal microscopy

Huh7 cells (8×10^4) were transfected in 6-well plates containing 12-mm coverslips with 1 µg a DNA containing plasmids expressing for HBc (or HBc derivatives) alone or containing a mixture of plasmid expressing for HBc (or HBc derivatives) and HBc-eGFP (or HBc-eGFP derivatives) in a ratio 0.7/0.3 to mimic conditions used for FLIM experiments. Cells expressing unlabeled proteins were washed in 1× PBS 24 h post-transfection, fixed by 4% of PFA and permeabilized with 0.2% triton/PBS. Then, cells were blocked for 30 min with 0.4% of BSA in 1× PBS, incubated with a human polyclonal anti-HBc (diluted 1:2500, [94]) and after successive washings, with Alexa 594 goat anti human (ThermoFisher scientific). DNA was stained with DAPI(2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, SIGMA) (1 mg/ml, 1:10000). Cell expressing unlabeled and labeled proteins were fixed by 4% of PFA, permeabilized with 0.2% triton/PBS and washed DAPI containing 1× PBS. Fluorescence confocal images were acquired using LEICA SP8 gSTED confocal microscope equipped with 63× (NA = 1.40). Excitation light was provided with laser diode at 405 nm for DAPI, an argon laser at 488 nm for Alexa 488 and white light laser at 594 nm for Alexa 594.

Cell sorting using FACS

Huh7 cells ($10 \times 10^{6)}$ plated in a T75 flask and transfected with 10 µg of plasmid expressing HBc were treated with trypsin and resuspended in ice-cold complete medium (DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS)). Cells were then sorted by using the BD FACS Melody and gating was done using the BD FACS Chorus™ software (BD Biosciences). Cell sorting was performed with 100-µm nozzle size and sorted directly into 1.5-ml tubes containing complete medium to minimize cellular stress. After establishing the basic gating parameters, GFP positive cells (1×10^5 to 8×10^5) of each population of interest were sorted at a speed of 6000 cells/s.

Immunogold labeling of cryosections: immunoelectron microscopy

Cells expressing HBc/HBc-eGFP for 24 h were sorted and fixed for 2 h with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6), washed twice with PBS (pH 7.6) and included in gelatin (12%). Infusion with sucrose (2.3 M) was performed overnight at 4 °C before ultrathin cryosectioning at −120 °C on a Leica Microsystems FC7 cryo-ultramicrotome. Sections (80-nm thickness) were retrieved with a methylcellulose (2%)/sucrose (2.3 M) mixture (1:1) and collected onto formvar/carbon-coated nickel grids. After removal of gelatin at 37 °C, sections were incubated with PBS containing 1:200 Rabbit anti-eGFP (ABCAM, ref. AB6556). After six washes of PBS (5 min each), the grids were incubated with PBS containing 1:30 gold-conjugated Goat anti-Rabbit (6 nm) (Aurion, Wageningen, the Netherlands). The grids were finally washed in PBS (six washes of 2 min each) and rinsed with distilled water. The contrasting step was performed by

incubating grids in a 2% uranyl acetate/2% methylcellulose mixture (1:10). The sections were imaged with a JEOLJEM-1011 transmission electron microscope operating at 100 kV (JEOL 1011).

FLIM

Huh7 cells were transfected in 24-well plates with glass bottom (Porvair sciences, ref. 324041) with a DNA mixture containing plasmids expressing HBc and HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) or HBc and HBc-eGFP together with HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2). The same ratio of plasmids was used for the expression of HBc-NTD, HBc-ΔαH3 and HBc-Δ124–135. This transfection was performed on three independent plates and incubated for 24, 48 and 72 h. Prior to FLIM analysis, cells were incubated in phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin [95].

FLIM analyses were performed in the time domain with a time-gatedcustom-built setup [96] and driven by Inscoper imaging suite (www.inscoper.com). Briefly, cells were excited at 480 ± 10 nm using a white light laser, and emission was selected using a band pass filter of 525/50 nm for GFP donor fluorescence. Fluorescence lifetime was calculated with five sequential temporal gates of 2.2 ns each. Mean pixel-by-pixel lifetime was calculated using the following equation: $\langle \tau \rangle = \Sigma \Delta t_i \cdot I_i / \Sigma \mathrm{Ii}$, where Δt_i is the delay time of the *i*th image acquired following a laser pulse and I_i is the pixel-by-pixel fluorescence intensity in each image. Lifetime measurements and online calculations were performed with the Inscoper software. Pixel-by-pixel lifetime was calculated only when fluorescence intensity was above 3000 gray levels. The FRET efficiency (*E*) was calculated according to:

$$E = 1 - \frac{\tau DA}{\tau D} \quad (1)$$

where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor.

FCS

Huh7 cells were transfected in 24-well plates with glass bottom (Porvair sciences, ref. 324,041) with a DNA mixture containing plasmids expressing HBc and HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3). As described for FLIM-FRET experiments, cells were incubated for 24, 48 and 72 h, and the medium was changed for phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin prior to analysis [95].

FCS measurements were performed using a confocal microscope with an FCS module as previously described [97,98]. Our setup was composed of a Leica SP8 (Leica) inverted confocal microscope with a 63× water objective with correcting ring (NA 1.2) and combined with a PicoQuant time-correlated single-photon counting module (PicoHarp, PicoQuant). For the eGFP fluorescence, the Argon laser line at 488 nm was used and fluorescence emission at 500–550 nm was collected after the confocal pinhole using an avalanche photodiode detector (MPD, PicoQuant). FCS measurements were carried out with the Symphotime software (PicoQuant), integrated into the LAS-AF software (Leica). For each cell, the fluctuation of the fluorescence intensity in the confocal volume was analyzed by monitoring three independent points in the cytosol. These points were acquired sequentially and in non-photobleaching conditions for 30 s each. The PCH method was used to determine the brightness of the diffusing particles. PCH data were fitted with the FFS Data Processor software (SSTC, Minsk, Belarus) using a two-species model, with *N*1 and *N*2 being the number of particles of the core monomer and oligomers having *q1* and *q2* brightness values, respectively. *q1*, the brightness of the monomeric HBc-eGFP protein was fixed during the fit by using the mean of brightness value found in the same experimental conditions for a control situation where eGFP was expressed alone in living cells after the single species model fit. *q2*/*q1* gives directly the number of HBc-eGFP molecules present in the oligomers. *N1q1* + *N2q2* is directly proportional to the cellular concentration of the HBc-eGFP expressed in the cell. The ratio of the concentration of the oligomeric HBc-eGFP to the total concentration of HBc-eGFP is obtained as follows:

$$R = \frac{N2q2}{N1q1 + N2q2} \quad (2)$$

and corresponds to the % of GFP in assembled particles. To measure protein concentration, we applied the following formula using Na, the Avogadro constant, and *V*, the volume of the confocal spot (estimated at 0.3×10^{-15} L):

$$[\mathrm{HBc\text{–}eGFP}] = \frac{N1q1 + N2q2}{\mathrm{Na} \times V \times q1} \quad (3)$$

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.026.

Acknowledgments

We thank Stéphane Bressanelli and Giulia Bertolin for careful reading of the manuscript. We thank M. Nassal for plasmids encoding HBc-eGFP. This work was supported by the INSERM, ANRS and Tours

University. We also thank the Electron Microscopy (EM) Facility (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support.

Author Contributions

Virgile Rat: methodology, FRET acquisition, image analysis. Xavier Pinson: methodology, acquisition of FCS, data treatment. Florian Seigneuret: TEM and molecular biology. Stéphanie Durand: TEM. Charline Herrscher: FRET analysis. Julien Burlaud-Gaillard: sample preparation for TEM. Christophe Hourioux: molecular biology. Philippe Roingeard: validation, editing. Roxane Lemoine: cell sorting. Marc Tramier: conceptualization, validation, methodology. Hugues de Rocquigny: conceptualization, funding acquisition, supervision, writing of the manuscript.

Received 17 February 2020;
Received in revised form 25 April 2020;
Accepted 28 April 2020
Available online 01 May 2020

Keywords:
HBV;
capsid;
HBc;
assembly;
FRET-FLIM

†V.R., X.P. and F.S. contributed equally to this work.

Abbreviations used:
HBV, hepatitis B virus; HBc, hepatitis B core; FRET, fluorescence resonance energy transfer; FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy; TEM, transmission electron microscopy.

References

[1] Neuveut, C., Wei, Y., Buendia, M.A., (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.,* **52**, *594–604.*
[2] Prange, R., (2012). Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol.,* **201**, *449–461.*
[3] Venkatakrishnan, B., Zlotnick, A., (2016). The structural biology of hepatitis B virus: form and function. *Annu. Rev. Virol.,* **3**, *429–451.*
[4] Nassal, M., (2015). HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut,* **64**, *1972–1984.*
[5] Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet (London, England),* **1**, *695–698.*
[6] Blumberg, B.S., (1977). Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science (New York, NY),* **197**, *17–25.*
[7] Bruss, V., (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.,* **13**, *65–73.*
[8] Hu, J., Liu, K., (2017). Complete and incomplete hepatitis B virus particles: formation, function, and application. *Viruses,* **9**,.
[9] Porterfield, J.Z., Dhason, M.S., Loeb, D.D., Nassal, M., Stray, S.J., Zlotnick, A., (2010). Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J. Virol.,* **84**, *7174–7184.*
[10] Heger-Stevic, J., Zimmermann, P., Lecoq, L., Bottcher, B., Nassal, M., (2018). Hepatitis B virus core protein phosphorylation: identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. *PLoS Pathog.,* **14**, *e1007488.*
[11] Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Williams, R.W., Steven, A.C., (1995). Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry,* **34**, *4919–4932.*
[12] Ludgate, L., Liu, K., Luckenbaugh, L., Streck, N., Eng, S., Voitenleitner, C., et al., (2016). Cell-free hepatitis B virus capsid assembly dependent on the Core protein C-terminal domain and regulated by phosphorylation. *J. Virol.,* **90**, *5830–5844.*
[13] Yang, S.Q., Walter, M., Standring, D.N., (1992). Hepatitis B virus p25 precore protein accumulates in *Xenopus* oocytes as an untranslocated phosphoprotein with an uncleaved signal peptide. *J. Virol.,* **66**, *37–45.*
[14] Seifer, M., Zhou, S., Standring, D.N., (1993). A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J. Virol.,* **67**, *249–257.*
[15] Ponsel, D., Bruss, V., (2003). Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.,* **77**, *416–422.*
[16] Koschel, M., Oed, D., Gerelsaikhan, T., Thomssen, R., Bruss, V., (2000). Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J. Virol.,* **74**, *1–7.*
[17] Lanford, R.E., Notvall, L., (1990). Expression of hepatitis B virus core and precore antigens in insect cells and characterization of a core-associated kinase activity. *Virology,* **176**, *222–233.*
[18] Patel, N., White, S.J., Thompson, R.F., Bingham, R., Weiss, E.U., Maskell, D.P., et al., (2017). HBV RNA pre-genome encodes specific motifs that mediate interactions with the viral core protein that promote nucleocapsid assembly. *Nat. Microbiol.,* **2**, *17098.*
[19] Wynne, S.A., Crowther, R.A., Leslie, A.G., (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell,* **3**, *771–780.*
[20] Zlotnick, A., Cheng, N., Conway, J.F., Booy, F.P., Steven, A. C., Stahl, S.J., et al., (1996). Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry,* **35**, *7412–7421.*
[21] Hatton, T., Zhou, S., Standring, D.N., (1992). RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.,* **66**, *5232–5241.*
[22] Nassal, M., (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.,* **66**, *4107–4116.*
[23] Lewellyn, E.B., Loeb, D.D., (2011). The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. *J. Virol.,* **85**, *1298–1309.*

[24] Chen, C., Wang, J.C., Zlotnick, A., (2011). A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog.*, **7**, *e1002388*.

[25] Wang, J.C., Dhason, M.S., Zlotnick, A., (2012). Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus. *PLoS Pathog.*, **8**, *e1002919*.

[26] Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., Kann, M., (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, *9849–9854*.

[27] Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M., Milanesi, G., (1989). A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.*, **63**, *4645–4652*.

[28] Yu, X., Jin, L., Jih, J., Shih, C., Zhou, Z.H., (2013). 3.5 Å cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein. *PloS One*, **8**, *e69729*.

[29] Watts, N.R., Conway, J.F., Cheng, N., Stahl, S.J., Belnap, D. M., Steven, A.C., et al., (2002). The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J.*, **21**, *876–884*.

[30] Liu, K., Luckenbaugh, L., Ning, X., Xi, J., Hu, J., (2018). Multiple roles of core protein linker in hepatitis B virus replication. *PLoS Pathog.*, **14**, *e1007085*.

[31] Chu, T.H., Liou, A.T., Su, P.Y., Wu, H.N., Shih, C., (2014). Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J. Virol.*, **88**, *2530–2543*.

[32] Gallucci, L., Kann, M., (2017). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and genome. *Viruses*, **9**,.

[33] Martinez, M.G., Testoni, B., Zoulim, F., (2019). Biological basis for functional cure of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.*, **26**, *786–794*.

[34] Bottcher, B., Wynne, S.A., Crowther, R.A., (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, **386**, *88–91*.

[35] Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Steven, A.C., (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, **386**, *91–94*.

[36] Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., et al., (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, **77**, *943–950*.

[37] Bourne, C.R., Finn, M.G., Zlotnick, A., (2006). Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. *J. Virol.*, **80**, *11055–11061*.

[38] Selzer, L., Katen, S.P., Zlotnick, A., (2014). The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. *Biochemistry*, **53**, *5496–5504*.

[39] Sun, D., Nassal, M., (2006). Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J. Hepatol.*, **45**, *636–645*.

[40] Kratz, P.A., Bottcher, B., Nassal, M., (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, *1915–1920*.

[41] Vogel, M., Diez, M., Eisfeld, J., Nassal, M., (2005). In vitro assembly of mosaic hepatitis B virus capsid-like particles (CLPs): rescue into CLPs of assembly-deficient core protein fusions and FRET-suited CLPs. *FEBS Lett.*, **579**, *5211–5216*.

[42] Yoo, L., Park, J.S., Kwon, K.C., Kim, S.E., Jin, X., Kim, H., et al., (2012). Fluorescent viral nanoparticles with stable in vitro and in vivo activity. *Biomaterials*, **33**, *6194–6200*.

[43] Weigand, K., Knaust, A., Schaller, H., (2010). Assembly and export determine the intracellular distribution of hepatitis B virus core protein subunits. *J. Gen. Virol.*, **91**, *59–67*.

[44] Chen, J.Y., Gan, C.Y., Cai, X.F., Zhang, W.L., Long, Q.X., Wei, X. F., et al., (2018). Fluorescent protein tagged hepatitis B virus capsid protein with long glycine-serine linker that supports nucleocapsid formation. *J. Virol. Methods*, **255**, *52–59*.

[45] Schodel, F., Wirtz, R., Peterson, D., Hughes, J., Warren, R., Sadoff, J., et al., (1994). Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes. *J. Exp. Med.*, **180**, *1037–1046*.

[46] Boulter, N.R., Glass, E.J., Knight, P.A., Bell-Sakyi, L., Brown, C.G., Hall, R., (1995). Theileria annulata sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in a vaccination trial. *Vaccine*, **13**, *1152–1160*.

[47] Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, **2**, *905–909*.

[48] Vogel, M., Vorreiter, J., Nassal, M., (2005). Quaternary structure is critical for protein display on capsid-like particles (CLPs): efficient generation of hepatitis B virus CLPs presenting monomeric but not dimeric and tetrameric fluorescent proteins. *Proteins*, **58**, *478–488*.

[49] Ning, X., Luckenbaugh, L., Liu, K., Bruss, V., Sureau, C., Hu, J., (2018). Common and distinct capsid and surface protein requirements for secretion of complete and genome-free hepatitis B virions. *J. Virol.*, **92**,.

[50] Deroubaix, A., Osseman, Q., Cassany, A., Begu, D., Ragues, J., Kassab, S., et al., (2015). Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.*, **96**, *183–195*.

[51] Rat, V., Seigneuret, F., Burlaud-Gaillard, J., Lemoine, R., Hourioux, C., Zoulim, F., et al., (2019). BAY 41-4109-mediated aggregation of assembled and misassembled HBV capsids in cells revealed by electron microscopy. *Antivir. Res.*, **169**, *104557*.

[52] El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., et al., (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*.

[53] Maldonado, J.O., Angert, I., Cao, S., Berk, S., Zhang, W., Mueller, J.D., et al., (2017). Perturbation of human T-cell leukemia virus type 1 particle morphology by differential Gag co-packaging. *Viruses*, **9**,.

[54] Tramier, M., Zahid, M., Mevel, J.C., Masse, M.J., Coppey-Moisan, M., (2006). Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc. Res. Tech.*, **69**, *933–939*.

[55] Padilla-Parra, S., Tramier, M., (2012). FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays*, **34**, *369–376*.

[56] Richert, L., Didier, P., de Rocquigny, H., Mély, Y., (2015). Monitoring HIV-1 protein oligomerization by FLIM FRET microscopy advanced time-correlated single photon counting applications. *Springer Series in Chemical Physics*, **111**, *277–307*.

[57] Pepperkok, R., Squire, A., Geley, S., Bastiaens, P.I., (1999). Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins

in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Biol.,* **9**, *269–272.*
[58] Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., et al., (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods,* **4**, *555–557.*
[59] Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., Beltram, F., (2009). Quantitative FRET analysis with the EGFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochem. Photobiol.,* **85**, *287–297.*
[60] Kumar, S., Alibhai, D., Margineanu, A., Laine, R., Kennedy, G., McGinty, J., et al., (2011). FLIM FRET technology for drug discovery: automated multiwell-plate high-content analysis, multiplexed readouts and application in situ. *Chemphyschem,* **12**, *609–626.*
[61] Teitler, M., Herrick-Davis, K., (2014). Determining the oligomer number of native GPCR using florescence correlation spectroscopy and drug-induced inactivation-reactivation. *Curr. Pharm. Biotechnol.,* **15**, *927–937.*
[62] Walter, A., Chapuis, C., Huet, S., Ellenberg, J., (2013). Crowded chromatin is not sufficient for heterochromatin formation and not required for its maintenance. *J. Struct. Biol.,* **184**, *445–453.*
[63] Macdonald, P., Johnson, J., Smith, E., Chen, Y., Mueller, J. D., (2013). Brightness analysis. *Methods Enzymol.,* **518**, *71–98.*
[64] Fogarty, K.H., Berk, S., Grigsby, I.F., Chen, Y., Mansky, L.M., Mueller, J.D., (2014). Interrelationship between cytoplasmic retroviral Gag concentration and Gag–membrane association. *J. Mol. Biol.,* **426**, *1611–1624.*
[65] Larson, D.R., Ma, Y.M., Vogt, V.M., Webb, W.W., (2003). Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J. Cell Biol.,* **162**, *1233–1244.*
[66] Hogue, I.B., Hoppe, A., Ono, A., (2009). Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag–Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J. Virol.,* **83**, *7322–7336.*
[67] Hendrix, J., Baumgartel, V., Schrimpf, W., Ivanchenko, S., Digman, M.A., Gratton, E., et al., (2015). Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J. Cell Biol.,* **210**, *629–646.*
[68] Ferrer, M., Henriet, S., Chamontin, C., Laine, S., Mougel, M., (2016). From cells to virus particles: quantitative methods to monitor RNA packaging. *Viruses,* **8**,.
[69] Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Krausslich, H.G., Eils, R., Rohr, K., et al., (2009). Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.,* **5**, *e1000652.*
[70] Prescher, J., Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Torrano, A.A., Brauchle, C., Muller, B., et al., (2015). Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites. *PLoS Pathog.,* **11**, *e1004677.*
[71] Favard, C., Chojnacki, J., Merida, P., Yandrapalli, N., Mak, J., Eggeling, C., et al., (2019). HIV-1 Gag specifically restricts PI (4,5)P2 and cholesterol mobility in living cells creating a nanodomain platform for virus assembly. *Sci. Adv.,* **5**, *eaaw8651.*
[72] Chojnacki, J., Muller, B., (2013). Investigation of HIV-1 assembly and release using modern fluorescence imaging techniques. *Traffic (Copenhagen, Denmark),* **14**, *15–24.*
[73] Inamdar, K., Floderer, C., Favard, C., Muriaux, D., (2019). Monitoring HIV-1 assembly in living cells: insights from dynamic and single molecule microscopy. *Viruses,* **11**,.
[74] Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., (2011). Visualizing HIV-1 assembly. *J. Mol. Biol.,* **410**, *501–511.*
[75] Sharma, K.K., Marzinek, J.K., Tantirimudalige, S.N., Bond, P. J., Wohland, T., (2019). Single-molecule studies of flavivirus envelope dynamics: experiment and computation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* **143**, *38–51.*
[76] Veerapathiran, S., Wohland, T., (2018). Fluorescence techniques in developmental biology. *J. Biosci.,* **43**, *541–553.*
[77] Chen, Y., Wei, L.N., Muller, J.D., (2003). Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **100**, *15492–15497.*
[78] Fogarty, K.H., Chen, Y., Grigsby, I.F., Macdonald, P.J., Smith, E.M., Johnson, J.L., et al., (2011). Characterization of cytoplasmic Gag–Gag interactions by dual-color z-scan fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.,* **100**, *1587–1595.*
[79] Chen, Y., Wu, B., Musier-Forsyth, K., Mansky, L.M., Mueller, J.D., (2009). Fluorescence fluctuation spectroscopy on viral-like particles reveals variable gag stoichiometry. *Biophys. J.,* **96**, *1961–1969.*
[80] Zhao, Q., Hu, Z., Cheng, J., Wu, S., Luo, Y., Chang, J., et al., (2018). Hepatitis B virus core protein dephosphorylation occurs during pregenomic RNA encapsidation. *J. Virol.,* **92**,.
[81] Jung, J., Hwang, S.G., Chwae, Y.J., Park, S., Shin, H.J., Kim, K., (2014). Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J. Virol.,* **88**, *8754–8767.*
[82] Su, P.-Y., Yang, C.-J., Chu, T.-H., Chang, C.-H., Chiang, C., Tang, F.-M., et al., (2016). HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids. *Sci. Rep., 38959.*
[83] Yeh, C.T., Liaw, Y.F., Ou, J.H., (1990). The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.,* **64**, *6141–6147.*
[84] Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A., (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.,* **145**, *45–55.*
[85] Mettenleiter, T.C., (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.,* **76**, *1537–1547.*
[86] Sundquist, W.I., Krausslich, H.G., (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.,* **2**, *a006924.*
[87] Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., et al., (2009). Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.,* **5**, *e1000563.*
[88] Zlotnick, A., Porterfield, J.Z., Wang, J.C., (2013). To build a virus on a nucleic acid substrate. *Biophys. J.,* **104**, *1595–1604.*
[89] Dokland, T., (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell. Mol. Life Sci.,* **56**, *580–603.*
[90] Konig, S., Beterams, G., Nassal, M., (1998). Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J. Virol.,* **72**, *4997–5005.*
[91] Nassal, M., Skamel, C., Kratz, P.A., Wallich, R., Stehle, T., Simon, M.M., (2005). A fusion product of the complete Borrelia burgdorferi outer surface protein A (OspA) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and

induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated OspA vaccine formula. *Eur. J. Immunol.,* **35**, *655–665.*

[92] Geldmacher, A., Skrastina, D., Petrovskis, I., Borisova, G., Berriman, J.A., Roseman, A.M., et al., (2004). An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. *Virology,* **323**, *108–119.*

[93] Park, J.S., Cho, M.K., Lee, E.J., Ahn, K.Y., Lee, K.E., Jung, J.H., et al., (2009). A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.,* **4**, *259–264.*

[94] Roingeard, P., Romet-Lemonne, J.L., Leturcq, D., Goudeau, A., Essex, M., (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology,* **179**, *113–120.*

[95] Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Reboutier, D., Prigent, C., Tramier, M., (2016). A FRET biosensor reveals spatio-temporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nat. Commun.,* **7**, *12674.*

[96] Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Heliot, L., Tramier, M., (2013). Spatio-temporal quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods [corrected]. *PLoS One,* **8**, *e69335.*

[97] Ziegler, C.S., Bouchab, L., Tramier, M., Durand, D., Fieschi, F., Dupre-Crochet, S., et al., (2019). Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.,* **294**, *3824–3836.*

[98] Bertolin, G., Sizaire, F., Demeautis, C., Chapuis, C., Merola, F., Erard, M., et al., (2019). Optimized FRET pairs and quantification approaches to detect the activation of Aurora kinase A at mitosis. *ACS Sens.,* **4**, *2018–2027.*

[99] Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G. H., Guo, J.T., et al., (1997). Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.,* **41**, *1715–1720.*

Annexe 3

Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase α and γ play a key role in targeting HIV-1 Pr55Gag to the plasma membrane

Running title: Role of PIP5K1 in HIV Pr55Gag Plasma Membrane Targeting

Baptiste Gonzales[a], Hugues de Rocquigny[a], Anne Beziau[a], Stephanie Durand[a], Julien Burlaud-Gaillard[a], Antoine Lefebvre[b], Sandra Krull[e], Patrick Emond[b], Denys Brand[a,c], Eric Piver[a,c#]

Manuscrit publié le 01 07 2020 dans *Journal of Virology*

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

JVI Accepted Manuscript Posted Online 6 May 2020
J. Virol. doi:10.1128/JVI.00189-20
Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase α and γ play a key role in targeting HIV-1 Pr55^{Gag} to the plasma membrane

Baptiste Gonzales,[a] Hugues de Rocquigny,[a] Anne Beziau,[a] Stephanie Durand,[a] Julien Burlaud-Gaillard,[a] Antoine Lefebvre,[b] Sandra Krull,[e] Patrick Emond[b], Denys Brand,[a,c] Eric Piver[a,c#]

[a]INSERM U1259, University of Tours, France
[b]INSERM U1253, University of Tours, France
[c]Biochimie et Biologie Moléculaire, Tours University Hospital, France
[d]Laboratoire de Virologie, Tours University Hospital, France
[e]Max Delbrueck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

Running Head: HIV, PIP5K1, Pr55^{Gag}, plasma membrane targeting.

Word count for the abstract: 210
Word count for the text (excluding the references, table footnotes, and figure legends): 5561

#Address correspondence to Eric Piver, piver_e@univ-tours.fr

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

Abstract

HIV-1 assembly occurs principally at the plasma membrane (PM) of infected cells. Gag polyprotein precursors ($Pr55^{Gag}$) are targeted to the PM and their binding is mediated by the interaction of myristoylated matrix domain and a PM-specific phosphoinositide, the phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate ($PI(4,5)P_2$). The major synthesis pathway of $PI(4,5)P_2$ involves the activity of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family type 1 composed of three isoforms (PIP5K1α, β and γ). To examine whether the activity of a specific PIP5K1 isoform determines proper $Pr55^{Gag}$ localization at the PM, we compared cellular behavior of $Pr55^{Gag}$ in the context of PIP5K1 inhibition using siRNAs that individually targeted each of the three isoforms in TZM-bl HeLa cells. We found that downregulation of PIP5K1α and PIP5K1γ strongly impaired the targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM with a rerouting of the polyprotein within intracellular compartments. The efficiency of $Pr55^{Gag}$ release was thus impaired through the silencing of these two isoforms while PIP5K1β is dispensable for $Pr55^{Gag}$ targeting to PM. The PM-mistargeting due to the silencing of PIP5K1α leads to $Pr55^{Gag}$ hydrolysis through lysosome and proteasome pathways while the silencing of PIP5K1γ leads to $Pr55^{Gag}$ accumulation in late endosomes. Our findings demonstrated that, within the PIP5K1s family, only the $PI(4,5)P_2$ pools produced by PIP5K1α and γ are involved in $Pr55^{Gag}$ PM targeting process.

Importance

PM specificity of $Pr55^{Gag}$ membrane binding is mediated through the interaction of $PI(4,5)P_2$ with the MA basic residues. It was shown that overexpression of a $PI(4,5)P_2$-depleting enzyme strongly impaired plasma membrane (PM) localization of $Pr55^{Gag}$. However, cellular factors that control $PI(4,5)P_2$-production required for $Pr55^{Gag}$-PM targeting have not yet been characterized. In this study, by individually inhibiting PIP5K1 isoforms, we elucidated a

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

correlation between PI(4,5)P_2-metabolism pathways mediated by PIP5K1 isoforms and the targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM of TZM-bl HeLa cells. Confocal microscopy analyses of cells depleted from PIP5K1α and γ show a rerouting of $Pr55^{Gag}$ to various intracellular compartments. Notably, $Pr55^{Gag}$ is degraded by the proteasome and/or by the lysosomes in PIP5K1α–depleted cells while $Pr55^{Gag}$ is targeted to endosomal vesicles in PIP5K1γ–depleted cells. Thus, our results highlight for the first time the roles of PIP5K1α and γ as determinants of $Pr55^{Gag}$ targeting to the PM.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

correlation between PI(4,5)P_2-metabolism pathways mediated by PIP5K1 isoforms and the targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM of TZM-bl HeLa cells. Confocal microscopy analyses of cells depleted from PIP5K1α and γ show a rerouting of $Pr55^{Gag}$ to various intracellular compartments. Notably, $Pr55^{Gag}$ is degraded by the proteasome and/or by the lysosomes in PIP5K1α–depleted cells while $Pr55^{Gag}$ is targeted to endosomal vesicles in PIP5K1γ–depleted cells. Thus, our results highlight for the first time the roles of PIP5K1α and γ as determinants of $Pr55^{Gag}$ targeting to the PM.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

endosomal recycling pathway (19). PIP5K1β is localized to vesicular structures in the perinuclear region, in which the $PI(4,5)P_2$ pool may be involved in actin dynamics and endocytosis (14, 18). Finally, the PIP5K1γ isoform has six splice variants, named PIP5K1γ-v1–6 (18, 20, 21). PIP5K1γ proteins are preferentially localized to the PM, cell-cell junctions or focal adhesions (18, 22–24). They are involved in various signaling processes, including the production of the $PI(4,5)P_2$ pool used to generate inositol 3-phosphate ($InsP_3$), which is involved in Ca^{2+} efflux and secretion (25).

$PI(4,5)P_2$ was shown to be essential for the targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM in studies using phosphoinositide 5-phosphatase IV, which depletes the cell of $PI(4,5)P_2$, causing the retargeting of $Pr55^{Gag}$ to late endosomes (6). More recently, the manipulation of $PI(4,5)P_2$ levels was shown to prevent the correct targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM and to cause the loss of pre-assembled $Pr55^{Gag}$ lattice from the PM (12). However, both these approaches deplete all $PI(4,5)P_2$ pools, regardless of PIP5Ks isoforms implication in $PI(4,5)P_2$ metabolism. We investigated the role of $PI(4,5)P_2$ in the targeting of $Pr55^{Gag}$ to the PM inner leaflet in more detail, by focusing on the cellular activity of PIP5Ks type 1 to study the effect of $PI(4,5)P_2$ metabolism on the intracellular distribution of $Pr55^{Gag}$.

To address this question, we transfected TZM-bl HeLa cells with siRNAs targeting the various PIP5K1 isoforms (α, β and γ). The decrease in total cellular $PI(4,5)P_2$ through PIP5K1 silencing was assessed by ultra-high pressure liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry ($UHPLC\text{-}HRMS^2$). This method made a semi-quantitative analysis of the distribution of $PI(4,5)P_2$ molecular species possible. PIP5K1 silencing led to a decrease in total cellular $PI(4,5)P_2$ levels, and this effect was particularly strong for PIP5K1α silencing. We then showed that the silencing of PIP5K1α or γ decreased the accumulation of $Pr55^{Gag}$ at the PM while the silencing of PIP5K1β had no effect. The PM-mistargeting due to the silencing of PIP5K1α led to $Pr55^{Gag}$ hydrolysis through lysosome and proteasome

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

pathways while the silencing of PIP5K1γ led to $Pr55^{Gag}$ accumulation in late endosomes. The disruption of these two pathways of $PI(4,5)P_2$ metabolism was thus found to alter the extracellular release of $Pr55^{Gag}$.

Results

The silencing of PIP5K1 isoforms decreases $PI(4,5)P_2$ production.

For identification of the PIP5K1 isoform involved in targeting $Pr55^{Gag}$ to the PM, we individually knocked down the expression of PIP5K1α, β and γ. We therefore transfected TZM-bl HeLa cells with siRNA mixtures or with untargeted siRNA as a control and the absolute number of copies of targeted messenger RNA was determined by RT-qPCR 72 h post transfection. The basal level of PIP5K1α mRNA was approximately seven times higher than those of PIP5K1β and PIP5K1γ (Fig. 1A, dark gray bars). PIP5K1 silencing decreased the amounts of the PIP5K1α, β and γ mRNAs by 80±12%, 70±7% and 76±10%, respectively (Fig. 1A, dashed bars). Consistent with this decrease, the levels of the corresponding protein isoforms were about 70 to 80% lower than those in control cells (Fig. 1B). An additional faint band, migrating slightly slower than the PIP5K1, was observed in Western blots using the PIP5K1α and β antibodies, which may correspond to an unspecific binding of the antibodies (26). Note that the antibodies used here for the Western blot analysis were found inefficient for immunofluorescence staining. The effect of each PIP5K1 isoform RNA knockdown on their PIPK5K1 RNA counterparts was also checked (Fig. 1C). Only the PIP5KIα mRNA was shown to be affected significantly, albeit weakly, in the context of siRNAs targeting PIP5K1β or PIP5K1γ (Fig. 1C, grey and green bars). However, PIP5K1β or γ mRNAs represent only ~15% of the overall PIP5K1 RNAs (Fig. 1A). Therefore, we assumed that the effect of PIP5K1α RNA knockdown on $Pr55^{Gag}$ subcellular localization was mostly linked to this isoform enzymatic activity.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

We next investigated the impact of PIP5K1 isoform silencing on $PI(4,5)P_2$ production, by extracting lipids from siRNA-transfected cells. The concentrations of $PI(4,5)P_2$ and its various fatty-acyl species were determined by UHPLC-$HRMS^2$. The addition of a known amount of $PI(4,5)P_2$ internal standard (C16:0/C16:0) before lipid extraction made it possible to estimate the amount of $PI(4,5)P_2$ total pool. The knockdown of PIP5K1α decreased the amount of $PI(4,5)P_2$ by 70±9% (Fig. 1D, blue bar) relative to the amount in experiments with non-targeting control siRNA (Fig. 1D, black bar), whereas the silencing of PIP5K1β and PIP5K1γ decreased the amount of cellular $PI(4,5)P_2$ by 45±8% and 44±12%, respectively (Fig. 1D gray and green bars). Taking into account the weak proportion of PIP5K1β and PIP5K1γ RNAs (Fig. 1A), this important decrease of $PI(4,5)P_2$ production was unexpected. Thus, the metabolic flux rate of each PIP5K1 isoform does not seem to be directly correlated with its concentration, as previously shown for other metabolic functions (27). Taken together, the higher amount of RNA found for the α isoform and the larger drop of $PI(4,5)P_2$ observed after its silencing suggest that this isoform produces most of the total cellular $PI(4,5)P_2$.

The knockdown of PIP5K1 isoforms has various effects on the broad range of $PI(4,5)P_2$ species.

We then investigated the impact of the silencing of the various PIP5K1 isoforms on the distribution of various fatty-acyl $PI(4,5)P_2$ species. By UHPLC-$HRMS^2$, the most sensitive tools to analyze this minor lipids family, we were able to identify 13 molecular species of $PI(4,5)P_2$ (Fig. 2). The response ratio of these molecular species ranged from 0.4 for the minority species 20:4/16:0 to 11.5 for the majority species 20:2/18:0 (Fig. 2, black bars). The depletion of an individual isoform significantly altered the production of all the species identified, with the exception of one of the minority species (C18:0/C16:0) identified in this cell type. The knockdown of PIP5K1α resulted in a sharp decrease in $PI(4,5)P_2$ levels,

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

particularly for molecular species bearing the C18:0 acyl chain and an unsaturated fatty acyl chain (Fig. 2, blue bars). Indeed, the levels of the C20:1/C18:0; C18:1/C18:0; C22:2/C18:0 and C20:2/C18:0 species were reduced by 6.5-, 5-, 4.5- and 3.5-fold, respectively (Fig. 2, compare the blue bars with the black bars). By contrast, the silencing of PIP5K1β (gray bars) and PIP5K1γ (green bars) had a lesser impact on the production of $PI(4,5)P_2$ molecular species. For example, the knockdown of these two isoforms had no significant effect on the production of the three species bearing the C20:4 fatty acyl chain. In addition, PIP5K1β depletion did not alter the basal expression of C18:1/C18:1 species (Fig. 2). Moreover, the production of the three species bearing the C18:1 fatty acyl chain was more strongly affected by the knockdown of PIP5K1α than by the knockdown of PIP5K1β and PIP5K1γ. The distribution of $PI(4,5)P_2$ molecular species was similar in HeLa cells and TZM-bl HeLa modified cells (data not shown). Our findings show that PIP5K1α activity is involved in the metabolism of a large range of $PI(4,5)P_2$ species, whereas the activities of PIP5K1β and PIP5K1γ have a more restricted involvement in this metabolism, consistent with the finding that PIP5K1α is responsible for most $PI(4,5)P_2$ production (Fig. 1D). Thus, PIP5K1α is the principal producer of $PI(4,5)P_2$ in the context of TZM-bl HeLa cells.

The knockdown of PIP5K1α and PIP5K1γ impairs HIV-1 $Pr55^{Gag}$ targeting to the plasma membrane.

We investigated whether the silencing of each PIP5K1 isoform and the resulting $PI(4,5)P_2$ depletion led to HIV-1 $Pr55^{Gag}$ mislocalization. We transfected TZM-bl HeLa cells with siRNAs and then with a mixture of plasmids encoding $Pr55^{Gag}$ and $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$ for an additional 24 h. The cells were then stained with the dSQ12S probe to delineate the PM (28) and analyzed by confocal microscopy. As shown in the upper row of figure 3A, $Pr55^{Gag}$ was partially distributed at the PM while the dSQ12S probe was uniformly delineating this PM.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

As a consequence, a partial colocalization of $Pr55^{Gag}$ and dSQ12S probe was observed with a yellow staining (Fig. 3A, row a). Punctate staining corresponding to the accumulation of $Pr55^{Gag}$ was also observed in the cytoplasm. The overlap between the two fluorescent reporters was calculated by the "Squassh" method, with double-labeling evaluated by calculating Pearson's correlation coefficients (R) across the whole image (29). Consistent with the yellow staining of the merged image (Fig. 3A, row a, merge), the $Pr55^{Gag}$ staining overlapped with staining for the dSQ12S probe with $R \sim 0.5$ (Fig. 3B, black dots). In sharp contrast, the depletion of PIP5K1α and γ had a major impact on the distribution of $Pr55^{Gag}$, with an accumulation of the viral protein in intracellular compartments (Fig. 3A, rows b and d). This accumulation resulted in a loss of colocalization of the two reporters with $0.05<R>0.1$ (Fig. 3B, blue and green dots). Conversely, the silencing of PIP5K1β had no effect on the cellular distribution of $Pr55^{Gag}$, with cells displaying the same R coefficient as cells transfected with the non-targeting control siRNA (Fig. 3A, row c and Fig. 3B, grey dots). Similar results for the silencing of the various PIP5K1 isoforms were obtained when $Pr55^{Gag}$ was expressed together with $Pr55^{Gag}$ translated from the pNL4.3 proviral construct, suggesting that the role of PIP5K1 in $Pr55^{Gag}$ targeting is identical when the full-length HIV-$1_{NL4.3}$ provirus genome is transfected (Fig. 3C and D). Overall, these results provide the first evidence of a role for the metabolism of $PI(4,5)P_2$ mediated by PIP5K1α and PIP5K1γ in the accumulation of $Pr55^{Gag}$ at the PM.

The silencing of PIP5K1α and PIP5K1γ has different effects on the retargeting of HIV-1 $Pr55^{Gag}$ to endosomal pathways.

We then sought to identify the subcellular compartments to which $Pr55^{Gag}$ was redirected in cells depleted of PIP5K1α or PIP5K1γ. Among vesicular markers, Rab GTPases are widely used to distinguish early or late endosomes and lysosomes (30). Rab 5 and Rab 7A are

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

proteins associated with early and late endosomal compartments, respectively (31). Thus, we transfected siRNA-treated cells with plasmids encoding $Pr55^{Gag}$/$Pr55^{Gag\text{-}cGFP}$ together with a plasmid encoding mCherry-tagged versions of Rab5 (Fig. 4A) or Rab7A (Fig. 4C). In order to make a comprehensive figure, only images corresponding to the overlay of green and red channels (merged images) were presented in the figure 4. In cell expressing mCherry-Rab5, we found that $Pr55^{Gag}$ did not accumulate in early endosomes whether the cells were treated with the non-targeting control siRNA or depleted from each PIP5K1 isoform (Fig. 4A and 4B). Likewise, in cells expressing mCherry-Rab7A, we found that $Pr55^{Gag}$ did not accumulate in late endosomes in cells transfected with the non-targeting control siRNA or depleted of PIP5K1β (Fig. 4C, images a and c and Fig. 4D, black and grey dots). Conversely, following the depletion of PIP5K1α or γ, much less $Pr55^{Gag}$ was detected at the PM (Fig. 3A and 3C, rows b and d), with accumulation of internal yellowish vesicles in the cytoplasm (Fig. 4C, images b and d). A quantification of the colocalization between $Pr55^{Gag}$ and Rab7A following the depletion of PIP5K1α and γ showed a double-staining for $Pr55^{Gag}$ and mCherry-Rab7A with R~0.25 (Fig. 4D, blue and green dots). These observations strongly suggest that knocking down the expression of PIP5K1α and γ led to the specific accumulation of the $Pr55^{Gag}$ precursor in late endosomes, whereas the knockdown of PIP5K1β had no impact on $Pr55^{Gag}$ distribution.

We then investigated the endosomal pathways followed by the late endosomes containing $Pr55^{Gag}$, using the LysoTracker probe, which stains lysosome vesicles. In cells treated with the non-targeting control siRNA or depleted of the PIP5K1β protein, a weak if any colocalization between $Pr55^{Gag}$ and the LysoTracker was observed (Fig. 4E, images a and c) giving rise to R <0.1 (Fig. 4F, black and grey dots). Intriguingly, the same absence of colocalization between $Pr55^{Gag}$ and LysoTracker staining was observed in cells depleted of PIP5K1γ (Fig. 4E, image d and Fig. 4F, green dots). By contrast, the depletion of PIP5K1α

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

induced a double-staining for $Pr55^{Gag}$ and the LysoTracker probe ($R \sim 0.29$) (Fig. 4F, blue dots), as shown by the yellow staining in PIP5K1α-depleted cells (Fig. 4E, image b). These data indicate that $Pr55^{Gag}$ follows the lysosomal pathway and that late endosomes containing $Pr55^{Gag}$ fuse with the acidic vesicles only after depletion of the PIP5K1α isoform but not after depletion of the PIP5K1γ isoform.

Effects of PIP5K1α and PIP5K1γ silencing on $Pr55^{Gag}$ release.

We investigated the role of each PIP5K1 isoform on $Pr55^{Gag}$ release by quantifying the level of $Pr55^{Gag}$ in cell lysate and supernatant of PIP5K1-depleted cells (Fig. 5). PIP5K1α-depleted cells had much lower levels of $Pr55^{Gag}$ in the cytoplasm than control cells (Fig. 5A, red rectangle in upper panel), whereas $Pr55^{Gag}$ levels were similar to those in control cells for both PIP5K1β- and PIP5K1γ-depleted cells (Fig. 5A, upper panel). The levels of $Pr55^{Gag}$ in the supernatant were lower than those recorded for control cells, by a factor of 3 for PIP5K1α-depleted cells and 1.5 for PIP5K1γ-depleted cells, whereas levels of $Pr55^{Gag}$ in the supernatant were unaffected in PIP5K1β-depleted cells (Fig. 5B, white bars). Thus, the treatment of cells by siRNA against PIP5K1α decreased the amount of cytoplasmic $Pr55^{Gag}$ and its release while the treatment of cells by siRNA against PIP5K1γ decreased only the release of $Pr55^{Gag}$. Then, the efficiency of $Pr55^{Gag}$ release was calculated by dividing the amount of $Pr55^{Gag}$ expression in the supernatant by the total amount of $Pr55^{Gag}$ expressed in both the supernatant and the cell lysate. In PIP5K1α- and PIP5K1β-depleted cells, $Pr55^{Gag}$ release efficiency was similar to that recorded for non-targeting control siRNA-treated cells (Fig. 5C, second and third white bars). By contrast, PIP5K1γ depletion decreased $Pr55^{Gag}$ release efficiency by one third (Fig. 5C, fourth white bar).

To overcome $Pr55^{Gag}$ hydrolysis, these experiments were repeated in the presence of MG132 proteasome inhibitor (Fig. 5A, lower panel). The addition of MG132 to PIP5K1α-depleted

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

cells restored the amount of cytoplasmic $Pr55^{Gag}$ almost to control levels (Fig. 5A, red rectangle in lower panel). A similar result was obtained when the cells were treated with the lysosomal inhibitor bafilomycin A1 (data not shown) (32). These observations confirmed that the depletion of PIP5K1α causes $Pr55^{Gag}$ hydrolysis. Surprisingly, this increase in the amount of $Pr55^{Gag}$ in the cytoplasm did not result in an increase in the amount of $Pr55^{Gag}$ in the supernatant, as the amount of p24 in the supernatant was similar for cells with and without MG132 treatment (Fig. 5B, compare second white and gray bars). The efficiency of $Pr55^{Gag}$ release was, therefore, almost halved (Fig. 5C, second gray bar). Thus, a wild type level of $Pr55^{Gag}$ in the cells treated with PIP5K1α siRNA and MG132 is not sufficient to counteract the absence of $PI(4,5)P_2$ in the membrane, emphasizing the essential role of this recognition during viral budding. Conversely, the amounts of $Pr55^{Gag}$ present in the cytoplasm (Fig. 5A) and supernatant of PIP5K1γ-depleted cells (Fig. 5B) were similar in the presence and absence of MG132 treatment. $Pr55^{Gag}$ release efficiency thus remained low in the presence of the proteasome inhibitor (Fig. 5C, fourth gray bar). This result, together with the lack of $Pr55^{Gag}$ and LysoTracker colocalization (Fig. 4), indicates that an absence of PIP5K1γ-mediated $PI(4,5)P_2$ production does not seem to induce $Pr55^{Gag}$ hydrolysis.

Overall, these results show that PIP5K1β is dispensable for $Pr55^{Gag}$ release, whereas PIP5K1α and PIP5K1γ are both involved in $Pr55^{Gag}$ release. In addition to decreasing release efficiency, our results indicate that the depletion of PIP5K1α has a critical effect on cytoplasmic $Pr55^{Gag}$ levels.

Discussion

The inner leaflet of the PM, which is enriched in $PI(4,5)P_2$, is targeted by $Pr55^{Gag}$ at late stages of the replication cycle. In this study, we determined the role of each PIP5K1 isoform in the cellular localization of $Pr55^{Gag}$ and its accumulation at the assembly site in TZM-bl

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

HeLa cells, a well-characterized model for studies of the HIV-1 replication cycle. Using a semi quantitative UHPLC-HRMS^2 approach, we showed that the knockdown of PIP5K1 isoforms decreased PI(4,5)P_2 levels to various extents (Fig. 1D and Fig. 2). The siRNA-based approach used here did not completely eliminate PI(4,5)P_2 from the cells, probably due to the well-described redundancy of production pathways (18, 33, 34). Consistent with the data shown in Fig. 1A, indicating that PIP5K1α is the principal isoform produced (in terms of the amount of mRNA), we showed that this isoform is also the principal isoform underlying total PI(4,5)P_2 production in TZM-bl HeLa cells (Fig. 1D). We identified 13 molecular species of PI(4,5)P_2 with different fatty acyl chain compositions in TZM-bl HeLa cells. The principal phosphoinositide species are known to carry C20:4/18:0 acyl chains (35–37), but our findings show that C20:2/C18:0 is the major PI(4,5)P_2 species in TZM-bl HeLa cells, followed by C18:1/C18:0 and C18:1/C18:1 (Fig. 2). Similar results have been reported for several transformed cell lines, and the low abundance of the C20:4/18:0 species is thought to be due to the culture medium used (38–41). Our results suggest that molecular species bearing C20:1/C18:0; C18:1/C18:0; C22:2/C18:0 and C20:2/C18:0 could be the principal species generated by PIP5K1α activity, suggesting the specificity of PIP5K1 isoforms for certain PI(4,5)P_2 species, consistent with previous *in vitro* studies in which PI(4)P was used as a substrate (42, 43).

The sequential depletion of PIP5K1 isoforms performed here revealed, for the first time, the importance of the isoforms PIP5K1α and γ, and the corresponding PI(4,5)P_2 metabolism, for the cellular trafficking of Pr55^{Gag}. Based on the effects of the depletion of PIP5K1α and γ, a relationship between PI(4,5)P_2 metabolism and Pr55^{Gag} localization was established. Pr55^{Gag} expression in TZM-bl HeLa cells leads to the accumulation of the protein mainly at the PM, although there is also some cytoplasmic labeling (Fig. 3A and 3C, rows a). The depletion of PIP5K1α results in a much lower level of Pr55^{Gag} accumulation at the PM (Fig. 3A and 3C,

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

rows b). This strong reduction may result from the decrease of $PI(4,5)P_2$ level at the membrane, consistent with the known importance of $PI(4,5)P_2$ concentration for the PM targeting of $Pr55^{Gag}$ (6, 12). Consequently, $Pr55^{Gag}$ is degraded by the proteasome (Fig. 5A) and/or by the lysosomes (Fig. 4E) in PIP5K1α–depleted cells. The MG132-mediated inhibition of $Pr55^{Gag}$ proteolysis restores cytoplasmic $Pr55^{Gag}$ level (Fig 5A, lower panel) but not $Pr55^{Gag}$ release efficiency (Fig. 5C, second grey bar). Interestingly, the depletion of Arf6, an activator of PIP5K1α, also resulted in a lower expression of $Pr55^{Gag}$ in HeLa cells (44). These findings indicate that PIKP5Kα inhibition results in lower level of intracellular $Pr55^{Gag}$ and a significantly lower extracellular release of $Pr55^{Gag}$. Another study did not find any decrease of HIV particles production in cells for which Arf6 was down regulated by siRNA (45). However, mammary epithelial MCF-7 cells were used to produce the HIV particles, which could explain the discrepancy in results. In our study, the ratio between the $Pr55^{Gag}$ expression in the supernatant and the total amount of $Pr55^{Gag}$ expression (supernatant and lysate of PIP5K1α-depleted cells) is similar to that obtained with the non-targeting siRNA (Fig. 5C, compare first and second white bars). This suggests that the residual level of $P(4,5)P_2$ generated by the β and γ isoforms or by other pathways is sufficient for the targeting of at least some $Pr55^{Gag}$ at the PM (33, 34). Moreover, the PIP5K1 isoforms have been reported to homo- or heterodimerize (46), and we cannot exclude a potential role of PIP5K1α/γ heterodimers in rescuing this residual level of PM-$PI(4,5)P_2$. This heterodimerization of the PIP5K1 isoforms and their specific cellular distribution may also explain why almost 50% of cellular $PI(4,5)P_2$ were conserved in cells treated with siRNAs targeting PIP5K1β or PIP5K1γ mRNAs (Fig 1D). In conclusion, the silencing of PIP5K1α, a protein located principally at the PM, where it controls membrane events and actin dynamics (14, 17, 18, 47), decreases the $PI(4,5)P_2$ concentration, in turn strongly reducing the release of $Pr55^{Gag}$ from the cell.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

The impact of the $PI(4,5)P_2$ generated by PIP5K1γ on the intracellular fate of $Pr55^{Gag}$ seems to involve another mechanism. In PIP5K1γ–depleted cells, much less $Pr55^{Gag}$ accumulates at the PM than in control cells (Fig. 3A and 3C, rows d), but $Pr55^{Gag}$ is mostly targeted to intracellular vesicles corresponding to late endosomes (Fig. 4C, image d). This retargeting of $Pr55^{Gag}$ to late endosomes seems to be similar to that observed in PIP5K1α–depleted cells (Fig. 4 C, image b). However, there are two key differences between PIP5K1α and PIP5K1γ. On one hand, $Pr55^{Gag}$ is not localized in lysosomes when the PIP5K1γ level is decreased (Fig. 4E, image d) and, on the other hand, the level of intracellular $Pr55^{Gag}$ is not affected by PIP5K1γ silencing (Fig. 5A). Nevertheless, despite this cytoplasmic accumulation of $Pr55^{Gag}$, lower levels of PM targeting result in lower levels of $Pr55^{Gag}$ release (Fig. 5C). The accumulation of $Pr55^{Gag}$ in late endosomes might have also favored an alternative trafficking pathway to the PM, which, however, does not rescue the release defect observed (48, 49). Thus, the depletion of PIP5K1γ has a profound impact on the cellular behavior of $Pr55^{Gag}$ despite the moderate contribution of this isoform to $PI(4,5)P_2$ production (Fig. 1D and Fig. 2). Furthermore, given that the PIP5K1α isoform, which is considered to be the principal producer of $PI(4,5)P_2$, is still active in PIP5K1γ-depleted cells, the observed defects seem to be related to local and specific pools of $PI(4,5)P_2$ dependent on PIP5K1γ activity, rather than total $PI(4,5)P_2$ levels. Interestingly, PIP5K1γ has been reported to display lipid kinase behavior in focal adhesion compartments (23, 50), and a previously study showed that an intracellular compartment referred to as a "focal adhesion-like structure" was essential for HIV assembly and budding in monocyte-derived macrophages (51). Thus, since depriving cells of PIP5K1γ disrupts the focal adhesion plaque (52), we can speculate that it may in turn decrease $Pr55^{Gag}$ release efficiency (Fig. 5).

In summary, we have identified PIP5K1α and PIP5K1γ as new determinants required for targeting the $Pr55^{Gag}$ to the PM in TZM-bl HeLa cells. We demonstrated the mistargeting of

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

383 $Pr55^{Gag}$ from the PM to internal cytoplasmic compartments when PIP5K1α and γ are silenced.
384 Further investigations are underway to determine whether these PIP5K1 isoforms acts
385 similarly in other cell models such as CD4 T cells or macrophages where the molecular
386 determinants directing $Pr55^{Gag}$ assembly to virus-containing compartments may be different
387 (53, 54).
388

389 ## Acknowledgements

390 This study was financially supported by a grant from the "Region Centre - Val de Loire"
391 (CalViC project, number 201500103990).
392

393 ## Materials and Methods

394 **Plasmids.**

395 Constructs encoding PIP5K1α and PIP5K1β were kindly provided by Yungfeng Feng (55).
396 Plasmids encoding GFP-PIP5K1γ90 (22300 and 22299 (56)) and mCherry-labeled Rab5 and
397 Rab7A (49201 (57) and 61804 (58)) were purchased from Addgene. The construction of
398 human codon-optimized plasmids encoding $Pr55^{Gag}$, $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$ and $Pr55^{Gag\text{-}mCherry}$ has been
399 described elsewhere (59, 60). The HIV-1 proviral DNA (pNL4-3) was (59, 60) obtained
400 through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID.
401

402 **Antibodies.**

403 The anti-PIP5K1α (C17, sc-11774), anti-HPRT (FL-218, sc-20975) and anti-β-actin
404 antibodies (I19, sc-1616) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-PIP5K1β
405 (ab1544818), anti-PIP5K1γ (ab109192) and anti-HIV1p24 (ab53841) antibodies were
406 purchased from Abcam. The HRP-conjugated donkey anti-goat (6420-05), and donkey anti-

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

rabbit (6440-05) secondary antibodies were purchased from Southern Biotech, and the rabbit anti-goat secondary antibody (ab6741) was obtained from Abcam.

siRNA and siRNA transfection.

All ON-TARGETplus RNA oligonucleotides and non-targeting control siRNAs (D-001810-01-05) were obtained from Thermo Scientific Dharmacon. The siRNA target sequences are as follows: PIP5K1α: 5'-AAAUCAGUGAGGGCUCGCCUA-3' and 5'-UUGAAAGGUGCCAUCCAGUUAGGC3-', PIP5K1β: 5'-UGUUGGGAAUUCAUUUCCUGGA-3' and 5'-CAGCAAAGGGUUACCUUCCAGUUCA-3', PIP5K1γ: 5'-AUCAUCAAGACCGUCAUGCAC-3' and 5'-GCCACCUUCUUUCGAAGAA-3' (61–63). For siRNA transfection, 2.5×10^5 TZM-bl HeLa cells were cultured in a six-well plate and transfected with 100 pmol of a pool of two siRNA sequences per isoform, with Lipofectamine RNAiMAX used according to the reverse protocol of the manufacturer (Invitrogen). Flow cytometry analyses showed that around 80% of cells were transfected when a fluorescently labeled siRNA (GLO-siRNA, Invitrogen) was used to check the transfection efficiency (data not shown).

Cell culture, transfection and $Pr55^{Gag}$ release assays.

TZM-bl HeLa cells (obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID) were maintained in high-glucose pyruvate-supplemented DMEM, with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES and gentamicin (50 µg/ml).

For live-cell imaging, 2×10^5 TZM-bl HeLa cells were cultured in 35-mm imaging dish (Ibidi) and transfected with siRNA as described above. After two days, cells were transfected with 0.8 µg of plasmid encoding wild type $Pr55^{Gag}$ and 0.2 µg of plasmid encoding $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$, with or without plasmids encoding mCherry-Rab5 or mCherry-Rab7A (ratio of 1:0.25:0.075), in the presence of jetPEI (Ozyme), according to the manufacturer's instructions. The $Pr55^{Gag}$

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

assembly obtained with the mixture of plasmids encoding wild type $Pr55^{Gag}$ and $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$, mixed in a ratio of 1:0.25, has been shown to resemble the wild-type virus in terms of $Pr55^{Gag}$ localization and particle morphology (59, 64, 65). The cells were mixed with 1 ml of phenol-free DMEM imaging medium 24 h after DNA transfection. For PM staining, cells were washed twice with phenol-free Opti-MEM medium and incubated with 1 ml of phenol-free medium containing 15 nM of dSQ12S probe (a gift from Andrey Klymchenko, Strasbourg). The incubation time was kept for 30 minutes, to minimize the entry of the dSQ12S probe and the staining of intracellular membranes (28). Alternatively, the $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$-encoding plasmid was replaced with a plasmid encoding $Pr55^{Gag\text{-}mCherry}$ in the transfection mix, and LysoTracker Green DND-26 (7526; Invitrogen) was used to stain acidic vesicles. The colors were then inverted with ImageJ to facilitate interpretation of the images obtained.

To quantify the efficiency of $Pr55^{Gag}$ release, $Pr55^{Gag}$ expression levels were measured in the cell supernatants by ELISA (Innotest HIV Antigen mAb, Fujirebio) and in the cell lysates by Western blotting (see below). The cells were treated or not with the proteasome inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich). MG132 was used at a final concentration of 10 µM and incubated for 6 h before cell lysis. The amounts of $Pr55^{Gag}$ found in the supernatant and the lysate of cells transfected with the non-targeting control siRNA were given the arbitrary value of 1. The levels of $Pr55^{Gag}$ in the supernatants and in the lysates of PIP5K1-depleted cells were expressed relative to this value of 1. $Pr55^{Gag}$ release efficiency was then calculated by dividing the amount of $Pr55^{Gag}$ found in the supernatant by the total amount of $Pr55^{Gag}$ (supernatant and lysate) and expressed as percentage compared to control cells transfected with non-targeting siRNA.

Microscopy.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

Live-cell imaging was performed at 37°C, with 5% CO_2, and a Leica TCS SP8 g-STED 3X inverted confocal microscope equipped with a 63×1.4NA oil immersion objective (HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS) (Leica). The analysis of the entire cell was performed by a z-stack acquisition. We obtained eGFP images by scanning the cells with a 488 nm laser line and a 500-555 nm band-pass filter for emission. The PM was detected, after incubating the cells with the dSQ12S probe for 30 min, with excitation at 632 nm and the use of a 640-750 nm band-pass filter for emission. For the mCherry images, a 558 nm laser line was used with a 605-730 nm band-pass filter.

SDS-PAGE and Western blot analysis.

Proteins were isolated with the NucleoSpin®RNA/protein kit (Macherey-Nagel), and the protein pellet was then solubilized in protein solubilizing buffer containing Tris 2-carboxyethyl-phosphine (PSB-TCEP), in accordance with the manufacturer's protocol. The total amount of protein was determined with a DS-11 spectrophotometer (DeNovix). Proteins were then denatured by heating and analyzed by SDS-PAGE in 8 to 16% polyacrylamide gels (Eurogentec). The protein bands obtained were transferred onto membranes, which were then probed with primary antibodies followed by the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies diluted in blocking solution (50 mM TBS, 0.05% Tween, 5% milk powder). Membranes were incubated with the Pierce ECL substrate (Thermo Scientific) and the signals were acquired with the ImageQuant LAS 500 system and analyzed with ImageQuant TL8.1 (GE Healthcare) or ImageJ software.

RT-qPCR.

Total RNA was isolated with the NucleoSpin®RNA/protein kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. We subjected 1 µg of total RNA to reverse transcription

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

with the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). The synthesized cDNA was then used for qPCR with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master system (Roche) and the following primers: PIP5K1α: forward-GAACGGTTCCAGCGCTTCAT reverse-GTCTCTCCAACTAGAGGTGA, PIP5K1β: forward-CCAGGAATGGAAGGATGAGA reverse-AATTGTGGTTGCCAAGGAAG, PIP5K1γ: forward-GCTACTTCCGGGAGCTCTTT reverse-CGTAGAAGAGGGAGCCACTG, HPRT1: forward-TGACCTTGATTTATTTTGCATAC reverse-CGAGCAAGACGTTCAGTCCT. The data were analyzed with LightCycler 480 software (Roche) and normalized to that of hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) mRNA. Absolute quantification was achieved by comparing the cycle threshold (CT) values of our samples to those of a range of standards.

Lipid extraction and LC-MS analysis.

For $PI(4,5)P_2$ quantification, we transfected 5×10^5 TZM-bl HeLa cells with siRNA as described above. Seventy-two hours post-transfection, cells were scraped into 1 ml of 1 M HCl at 4°C and centrifuged (15,000 x *g*, 5 min, 4°C). Pellets were resuspended in a mixture of methanol/$CHCl_3$/1 M HCl (52.6/26.2/2.6%) in water, with PI(4)P-diC16 and $PI(4,5)P_2$-diC16 (Tebu-bio) added as internal standards. After addition of $CHCl_3$/2 M HCl (80/20%) and centrifugation (1,500 x *g*, 5 min at room temperature), the organic phase was collected. The solvent was then evaporated with a SpeedVac at 35°C and the residues were resuspended in 500 µL of methanol. A derivatization step was performed by adding 50 µl of CH_2N_2 followed by an incubation at room temperature for 30 minutes. This operation was done twice. Finally, the reaction was stopped by adding 10 µl of acetic acid. The reaction mixture was evaporated, and the residues were resuspended in 100 µl of CH_3CN/H_2O (10% / 90%). Twenty-five microliters of each sample was then injected for LC-MS analysis using a UHPLC Dionex™ Ultimate 3000 (Waters Acquity UPLC BEH300 C4 column, 45°C) with 0.1% formic acid in

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

water as phase A and 0.1% formic acid in CH_3CN as phase B, at a flow rate of 0.26 mL/min. Gradient phase was as follows: 0-5 min: 100% of A, 5-8 min: 80% to 55% of A, 8-25 min: 55% to 30 % of A, 25-30 min: 30% to 100% of A, 30-32.5 min: 100% of A, 32.5 to 37 min: 0% of A. LC was coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a heated electrospray ionization source (HESI). The HESI parameters in positive polarity were as follows: sheath gas flow rate: 35; auxiliary gas flow rate: 10; sweep gas flow rate: 1; spray voltage: 3.50 kV; capillary temperature: 350°C; S-lens RF level: 60.0; heater temperature: 250°C. The full-scan acquisition parameters were as follows: resolution: 70,000; AGC target: 1e6; max IT: 100 ms; scan range: 850–1300. The parameters of top 10 data dependent MS^2 were as follows: resolution: 35,000; isolation window: 1.0 *m/z*; collision energy: 20; AGC target: 1e6; max IT: 200 ms. Identification of each lipid was done based on the retention time associated to high resolution full MS parent ion and confirmed by high resolution MS^2 acquisition. Distinction between PIP and PIP_2 was realized based on neutral loss of each lipid family. Chain lengths were determined based on mass fragment obtained during MS^2 experiments. MS and MS^2 of each PIP and PIP_2 are available upon request. For each identified lipid, chromatographic peak areas were obtained using Excalibur processing setup (Thermo Fisher). Internal standards peak areas were used to normalize the amounts of each lipid. PI(4)P-diC16 internal standard was used to normalized PIP lipids and PI(4,5)P_2-diC16 for PIP_2 lipids. This normalization step was done by dividing signal intensity by that of the appropriate internal standard. Semi-quantitative results are thus obtained and enable comparisons between samples.

Statistical and image analysis.

All our data were analyzed in non-parametric Mann-Whitney tests. The distribution of $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$ and its colocalization with the dSQ12S probe and mCh-Rab7A were

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

quantitatively analyzed from the two-color confocal images obtained with the "Squassh" plugin in ImageJ software (29). The "Squassh" method allows images segmentation and quantification of the distribution, size and intensity of transmitted signals. Therefore, the software delineates the fluorescent object in each channel and calculates their overlap. The software provides then the Pearson correlation coefficient accounting for the colocalization of the different markers in each condition. We followed step by step the protocol previously described by Rizk *et al.* (29). The software generates the *R* script "*R*_analysis". *R* was used to perform one-way ANOVA for the statistical analysis of differences between datasets. The distribution of $Pr55^{Gag\text{-}mCherry}$ and its colocalization with the LysoTracker Green probe were evaluated by the same method.

Bibliography

1. Hermida-Matsumoto L, Resh MD. 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. J Virol 74:8670–8679.
2. Freed EO. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. Nat Rev Microbiol 13:484–496.
3. Bryant M, Ratner L. 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci 87:523–527.
4. Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A 86:5781–5785.
5. Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD. 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. J Virol 68:2556–69.
6. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. 2004. Phosphatidylinositol

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

(4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 101:14889–94.

7. Shkriabai N, Datta SAK, Zhao Z, Hess S, Rein A, Kvaratskhelia M. 2006. Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. Biochemistry 45:4077–4083.

8. Chukkapalli V, Hogue IB, Boyko V, Hu W-S, Ono A. 2008. Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient Gag membrane binding. J Virol 82:2405–2417.

9. Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W, Wenk MR. 2008. Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. J Virol 82:11228–11238.

10. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF. 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. Proc Natl Acad Sci 103:11364–11369.

11. Mercredi PY, Bucca N, Loeliger B, Gaines CR, Mehta M, Bhargava P, Tedbury PR, Charlier L, Floquet N, Muriaux D, Favard C, Sanders CR, Freed EO, Marchant J, Summers MF. 2016. Structural and molecular determinants of membrane binding by the HIV-1 matrix protein. J Mol Biol 428:1637–1655.

12. Mücksch F, Laketa V, Müller B, Schultz C, Kräusslich H-G. 2017. Synchronized HIV assembly by tunable PIP2 changes reveals PIP2 requirement for stable Gag anchoring. Elife 6:1–26.

13. Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF. 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. Proc Natl Acad Sci U S A 101:517–522.

14. Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. 2003. Phosphatidylinositol phosphate

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

kinases put PI4,5P 2 in its place. J Membr Biol 194:77–89.

15. Mellman DL, Gonzales ML, Song C, Barlow CA, Wang P, Kendziorski C, Anderson RA. 2008. A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. Nature 451:1013–1017.

16. Boronenkov I V., Loijens JC, Umeda M, Anderson RA. 1998. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing Pre-mRNA processing factors. Mol Biol Cell 9:3547–3560.

17. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman M a, Kanaho Y. 1999. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. Cell 99:521–532.

18. Balla T. 2013. Phosphoinositides: Tiny lipids with giant impact on cell regulation. Physiol Rev 93:1019–1137.

19. Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. J Cell Biol 154:1007–1017.

20. Schill NJ, Anderson RA. 2009. Two novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type Igamma splice variants expressed in human cells display distinctive cellular targeting. Biochem J 422:473–82.

21. van den Bout I, Divecha N. 2009. PIP5K-driven PtdIns(4,5)P2 synthesis: Regulation and cellular functions. J Cell Sci 122:3837–3850.

22. Oude Weernink PA, Schmidt M, Jakobs KH. 2004. Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. Eur J Pharmacol 500:87–99.

23. Ling K, Doughman RL, Firestone AJ, Bunce MW, Anderson RA. 2002. Type Iγ phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. Nature 420:89–93.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

606 24. Akiyama C, Shinozaki-Narikawa N, Kitazawa T, Hamakubo T, Kodama T, Shibasaki
607 Y. 2005. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase gamma is associated with cell-cell
608 junction in A431 epithelial cells. Cell Biol Int 29:514–20.
609 25. Wang YJ, Li WH, Wang J, Xu K, Dong P, Luo X, Yin HL. 2004. Critical role of
610 PIP5KIγ87 in InsP 3 -mediated Ca 2+ signaling. J Cell Biol 167:1005–1010.
611 26. Volpicelli-Daley LA, Lucast L, Gong L-W, Liu L, Sasaki J, Sasaki T, Abrams CS,
612 Kanaho Y, De Camilli P. 2010. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases and
613 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the brain. J Biol Chem 285:28708–
614 28714.
615 27. Hoppe A. 2012. What mRNA abundances can tell us about metabolism. Metabolites
616 2:614–631.
617 28. Karpenko IA, Collot M, Richert L, Valencia C, Villa P, Mély Y, Hibert M, Bonnet D,
618 Klymchenko AS. 2015. Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as
619 bright far-red probes for background-free bioimaging. J Am Chem Soc 137:405–412.
620 29. Rizk A, Paul G, Incardona P, Bugarski M, Mansouri M, Niemann A, Ziegler U, Berger
621 P, Sbalzarini IF. 2014. Segmentation and quantification of subcellular structures in
622 fluorescence microscopy images using Squassh. Nat Protoc 9:586–596.
623 30. Zerial M, Parton R, Chavrier P, Frank R. 1992. Localization of Rab family members in
624 animal cells. Methods Enzymol 219:398–407.
625 31. Wandinger-Ness A, Zerial M. 2014. Rab proteins and the compartmentalization of the
626 endosomal system. Cold Spring Harb Perspect Biol 6:a022616–a022616.
627 32. Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, Shimizu Y, Terasawa K. 1995. Inhibitory effect of
628 bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of
629 influenza A and B viruses in MDCK cells. Antiviral Res 4:425–30.
630 33. Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. 2008. Function and

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

631 dysfunction of the PI system in membrane trafficking. EMBO J 27:2457–2470.
632 34. Burke JE. 2018. Structural basis for regulation of phosphoinositide kinases and their
633 involvement in human disease. Mol Cell 71:653–673.
634 35. Pettitt TR, Dove SK, Lubben A, Calaminus SDJ, Wakelam MJO. 2006. Analysis of
635 intact phosphoinositides in biological samples. J Lipid Res 47:1588–96.
636 36. Milne SB, Ivanova PT, DeCamp D, Hsueh RC, Brown HA. 2005. A targeted mass
637 spectrometric analysis of phosphatidylinositol phosphate species. J Lipid Res 46:1796–
638 1802.
639 37. D'Souza K, Epand RM. 2014. Enrichment of phosphatidylinositols with specific acyl
640 chains. Biochim Biophys Acta - Biomembr 1838:1501–1508.
641 38. Ogiso H, Taguchi R. 2008. Reversed-phase LC/MS method for polyphosphoinositide
642 analyses: Changes in molecular species levels during epidermal growth factor
643 activation in A431 cells. Anal Chem 80:9226–9232.
644 39. Clark J, Anderson KE, Juvin V, Smith TS, Karpe F, Wakelam MJO, Stephens LR,
645 Hawkins PT. 2011. Quantification of PtdInsP 3 molecular species in cells and tissues
646 by mass spectrometry. Nat Methods 8:267–272.
647 40. Rouzer CA, Ivanova PT, Byrne MO, Milne SB, Marnett LJ, Brown HA. 2006. Lipid
648 profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: Structural and functional
649 implications †. Biochemistry 45:14795–14808.
650 41. Traynor-Kaplan A, Kruse M, Dickson EJ, Dai G, Vivas O, Yu H, Whittington D, Hille
651 B. 2017. Fatty-acyl chain profiles of cellular phosphoinositides. Biochim Biophys Acta
652 - Mol Cell Biol Lipids 1862:513–522.
653 42. Shulga Y V., Anderson RA, Topham MK, Epand RM. 2012. Phosphatidylinositol-4-
654 phosphate 5-kinase isoforms exhibit acyl chain selectivity for both substrate and lipid
655 Activator. J Biol Chem 287:35953–35963.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

656 43. Shulga Y V., Topham MK, Epand RM. 2011. Study of arachidonoyl specificity in two
657 enzymes of the PI cycle. J Mol Biol 409:101–112.
658 44. Joshi A, Garg H, Nagashima K, Bonifacino JS, Freed EO. 2008. GGA and Arf proteins
659 modulate retrovirus assembly and release. Mol Cell 30:227–238.
660 45. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, Slavík J, Machala
661 M, Zimmermann P. 2014. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into
662 multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. Nat Commun 5:445–56.
663 46. Lacalle RA, De Karam JC, Martínez-Muñoz L, Artetxe I, Peregil RM, Sot J, Rojas
664 AM, Goñi FM, Mellado M, Mañes S. 2015. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-
665 kinase homo and heterodimerization determines its membrane localization and activity.
666 FASEB J 29:2371–2385.
667 47. Doughman RL, Firestone AJ, Wojtasiak ML, Bunce MW, Anderson RA. 2003.
668 Membrane ruffling requires coordination between type I phosphatidylinositol
669 phosphate kinase and Rac signaling. J Biol Chem 278:23036–23045.
670 48. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang J-M, Hildreth JEK, Gould SJ. 2006. Exosomes
671 and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. J Cell
672 Biol 172:923–935.
673 49. Kemler I, Meehan A, Poeschla EM. 2010. Live-cell coimaging of the genomic RNAs
674 and Gag proteins of two lentiviruses. J Virol 84:6352–6366.
675 50. Ling K, Schill NJ, Wagoner MP, Sun Y, Anderson RA. 2006. Movin' on up: the role
676 of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. Trends Cell Biol 16:276–84.
677 51. Pelchen-Matthews A, Giese S, Mlčochová P, Turner J, Marsh M. 2012. β2 Integrin
678 adhesion complexes maintain the integrity of HIV-1 assembly compartments in
679 primary macrophages. Traffic 13:273–291.
680 52. Wu Z, Li X, Sunkara M, Spearman H, Morris AJ, Huang C. 2011. PIPKIγ regulates

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

focal adhesion dynamics and colon cancer cell invasion. PLoS One 6:e24775.

53. Inlora J, Chukkapalli V, Bedi S, Ono A. 2016. Molecular determinants directing HIV-1 Gag assembly to virus-containing compartments in primary macrophages. J Virol 90:8509–19.

54. Joshi A, Ablan SD, Soheilian F, Nagashima K, Freed EO. 2009. Evidence that productive human immunodeficiency virus type 1 assembly can occur in an intracellular compartment. J Virol 83:5375–5387.

55. Kisseleva M, Feng Y, Ward M, Song C, Anderson RA, Longmore GD. 2005. The LIM protein Ajuba regulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels in migrating cells through an interaction with and activation of PIPKI alpha. Mol Cell Biol 25:3956–66.

56. Di Paolo G, Pellegrini L, Letinic K, Cestra G, Zoncu R, Voronov S, Chang S, Guo J, Wenk MR, De Camilli P. 2002. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1γ by the FERM domain of talin. Nature 420:85–89.

57. Friedman JR, Webster BM, Mastronarde DN, Verhey KJ, Voeltz GK. 2010. ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. J Cell Biol 190:363–375.

58. Rowland AA, Chitwood PJ, Phillips MJ, Voeltz GK. 2014. ER contact sites define the position and timing of endosome fission. Cell 159:1027–1041.

59. El Meshri SE, Dujardin D, Godet J, Richert L, Boudier C, Darlix JL, Didier P, Mély 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.

60. Muller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Krausslich H-G. 2004. Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. J Virol 78:10803–10813.

Journal of Virology JVI Journal of Virology

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

706 61. Micucci F, Capuano C, Marchetti E, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Galandrini R. 2008.
707 PI5KI-dependent signals are critical regulators of the cytolytic secretory pathway.
708 Blood 111:4165–4172.
709 62. Xu Q, Zhang Y, Xiong X, Huang Y, Salisbury JL, Hu J, Ling K. 2014. PIPKI targets to
710 the centrosome and restrains centriole duplication. J Cell Sci 127:1293–1305.
711 63. Padrón D, Wang YJ, Yamamoto M, Yin H, Roth MG. 2003. Phosphatidylinositol
712 phosphate 5-kinase Iβ recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of
713 constitutive endocytosis. J Cell Biol 162:693–701.
714 64. Hübner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK. 2007. Sequence of
715 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization
716 monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged
717 HIV-1. J Virol 81:12596–607.
718 65. Müller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Kräusslich H-G. 2004.
719 Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human
720 immunodeficiency virus type 1 derivative. J Virol 78:10803–13.
721

722 **Legends**

723 **FIG. 1. The silencing of PIP5K1 isoforms decreases PI(4,5)P_2 production.**

724 TZM-bl HeLa cells were transfected with either a non-targeting control siRNA or with
725 siRNAs targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ. Data were collected 72 h after siRNA
726 transfection. (A) The silencing of each PIP5K1 isoforms was assessed by RT-qPCR
727 measurements of the corresponding mRNA expression, on the basis of comparison with the
728 non-targeting control siRNA. The absolute number of PIP5K1 mRNA copies was determined
729 by comparison with a range of standards, with normalization against HPRT1 mRNA as an
730 internal control. (B) The knockdown of PIP5K1 proteins was assessed by Western blotting,

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

with HPRT1 proteins used to verify protein loading between lanes. (C) The impact of silencing a single PIP5K1 isoform on the two others was assessed by RT-qPCR, on the basis of comparison with the non-targeting control siRNA, as described previously for A. (D) The effect of each PIP5K1 isoform silencing on total cellular $PI(4,5)P_2$ level was determined by $UHPLC\text{-}HRMS^2$. For panels A, C and D, the data shown are expressed as the mean ± the standard error of the mean (SEM) from three independent experiments performed in triplicate. The p values shown were obtained with Mann-Whitney tests for panels A, C and D. Significant results (**** for p value < 0.0001, *** 0.0001 < p value < 0.001, ** 0.001 < p value < 0.01, * 0.01 < p value < 0.05, ns = not significant) are indicated.

FIG. 2. The knockdown of PIP5K1 isoforms has various effects on the distribution of $PI(4,5)P_2$ species.

Lipids were extracted from the lysate of TZM-bl HeLa cells three days after transfection with either a non-targeting control siRNA or with siRNAs targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ. The effect of PIP5K1 isoform silencing on the distribution of $PI(4,5)P_2$ molecular species was assessed by $UHPLC\text{-}HRMS^2$. The histogram shows the response ratio of each $PI(4,5)P_2$ molecular species area peak from the lysate of cells transfected with the non-targeting control siRNA (black bars) or an siRNA targeting PIP5K1α, β or γ (blue, gray and green bars, respectively). The data shown are the means and SEM of three independent experiments conducted in triplicate. Mann-Whitney tests were performed to assess the significance of differences. Significant results (**** for p value < 0.0001, *** 0.0001 < p value < 0.001, ** 0.001 < p value < 0.01, * 0.01 < p value < 0.05, ns = not significant) are indicated. Stars indicate a significant decrease in the amount of a particular molecular species relative to the basal amount present in control cells. The stars above the black lines indicate significant differences in amounts of molecular species between siRNA-PIP5K1α-transfected cells and

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

the cells transfected with other siRNAs.

FIG. 3. The knockdown of PIP5K1α and PIP5K1γ impairs HIV-1 $Pr55^{Gag}$ localization to the plasma membrane.

TZM-bl HeLa cells, transfected with either a non-targeting control siRNA or with siRNAs targeting each PIP5K1 isoform, were then transfected with plasmids expressing $Pr55^{Gag}$/$Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$ or with a replication-competent HIV provirus plasmid pNL4.3 and a $Pr55^{Gag\text{-}eGFP}$ expressing plasmid. One day after transfection, the PM of the cells were stained with the dSQ12S probe and living cells were imaged by confocal microscopy. (A) Effect of PIP5K1 isoform silencing on the distribution of $Pr55^{Gag}$ in transfected cells. Representative z-stack images (green for $Pr55^{Gag}$, red for the dSQ12S probe and yellow for the merged channels) for cells transfected with non-targeting control siRNA or siRNA targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ (a, b, c and d, respectively) are shown. (B) The colocalization of $Pr55^{Gag}$ with the PM probe (dSQ12S) was quantified with ImageJ software. Each dot represents the average of *R* for 10 z-stack images of a cell. Horizontal black bars stand for the mean value. (C) Effect of PIP5K1 isoforms silencing on the distribution of $Pr55^{Gag}$ produced by the replication-competent HIV-$1_{NL4.3}$ in transfected cells. Representative z-stack images (green for $Pr55^{Gag}$, red for the dSQ12S probe and yellow for the merged channels) from cells transfected with non-targeting control siRNA or siRNAs targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ (a, b, c and d, respectively) are shown. (D) The colocalization of $Pr55^{Gag}$ produced by the replication-competent HIV-$1_{NL4.3}$ with the PM probe dSQ12S was quantified with ImageJ software. Each dot represents the average of *R* for 10 z-stack images of a cell. Horizontal black bars stand for the mean value. Mann-Whitney tests were performed to assess the significance of differences. Significant results (**** p value < 0.0001, ns = not significant) are indicated.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

781

782 **FIG. 4. The silencing of PIP5K1α and PIP5K1γ has different effects on the retargeting**
783 **of HIV-1 Pr55^{Gag} to endosomal pathways.**

784 (A) Effect of the silencing of PIP5K1 isoforms on the rerouting of Pr55^{Gag} to early
785 endosomes. TZM-bl HeLa cells, transfected with either a non-targeting control siRNA or with
786 siRNAs targeting each PIP5K1 isoform, were then transfected with plasmids encoding
787 Pr55^{Gag}/Pr55$^{Gag\text{-}eGFP}$ and mCh-Rab5. Z-stack confocal images were acquired from living cells
788 as previously described. Representative yellow merged images (green for Pr55^{Gag} and red for
789 mCh-Rab5) are shown for cells transfected with non-targeting control siRNA or siRNA
790 targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ (a, b, c and d, respectively). (B) The colocalization
791 of Pr55$^{Gag\text{-}eGFP}$ with mCh-Rab5 was quantified with ImageJ software. Each dots represents the
792 average of *R* for 10 z-stack images of a representative cell. Horizontal black bars stand for the
793 mean value. (C) Effect of the silencing of PIP5K1 isoforms on the rerouting of Pr55^{Gag} to late
794 endosomes. TZM-bl HeLa cells, transfected with either a non-targeting control siRNA or with
795 siRNAs targeting each PIP5K1 isoform, were then transfected with plasmids encoding
796 Pr55^{Gag}/Pr55$^{Gag\text{-}eGFP}$ and mCh-Rab7A. Z-stack confocal images were acquired from living
797 cells as previously described. Representative yellow merged images (green for Pr55^{Gag} and
798 red for mCh-Rab7A) are shown for cells transfected with non-targeting control siRNA or
799 siRNA targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ (a, b, c and d, respectively). (D) The
800 colocalization of Pr55$^{Gag\text{-}eGFP}$ with mCh-Rab7A was quantified with ImageJ software. Each
801 dots represents the average of *R* for 10 z-stack images of a representative cell. Horizontal
802 black bars stand for the mean value. (E) Effect of PIP5K1 isoform silencing on the
803 relocalization of Pr55^{Gag} to acidic vesicles. TZM-bl HeLa cells, transfected with either a non-
804 targeting control siRNA or with siRNAs targeting each PIP5K1 isoform, were cotransfected
805 with Pr55^{Gag} and Pr55$^{Gag\text{-}mCherry}$-expressing plasmids. Lysosomes were stained in green with

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online

Journal of Virology

JVI

Journal of Virology

the LysoTracker probe 24 h hours after DNA transfection. Acquisitions of z-stack confocal images were performed as previously described and the colors of $Pr55^{Gag\text{-}mCherry}$ and the green LysoTracker probe were inversed to prevent confusion. Representative yellow merged images (green for $Pr55^{Gag}$ and red for the Lysotracker probe) are shown for cells transfected with non-targeting control siRNA or siRNA targeting PIP5K1α, PIP5K1β or PIP5K1γ (a, b, c and d, respectively). (F) The colocalization of $Pr55^{Gag\text{-}mCherry}$ with the green Lysotracker probe was quantified with ImageJ software. Each dots represents the average of *R* for 10 z-stack images of a representative cell. Horizontal black bars stand for the mean value. Mann-Whitney tests were performed to assess the significance of differences. Significant results (**** for p value < 0.0001, *** 0.0001 < p value < 0.001, ns = not significant) are indicated.

FIG. 5. Silencing of PIP5K1α and PIP5K1γ impairs $Pr55^{Gag}$ targeting to PM and release into the cell supernatant.

TZM-bl HeLa cells, transfected with siRNA targeting the PIP5K1 isoforms, were then transfected with a $Pr55^{Gag}$-encoding plasmid. One-day post transfection, cells were treated with 10 µM of MG132. (A) The level of intracellular $Pr55^{Gag}$ expression was analyzed by Western blotting 48 h post transfection. The β-actin protein was used to normalize protein loading between lanes. The bands in the top part of each panel correspond to the $Pr55^{Gag}$ in siRNA-transfected cells without (upper panel) or with MG132 (lower panel) treatment, and the results shown are representative of three independent experiments (each in duplicate). Chemiluminescence analysis was performed with ImageJ software to assess $Pr55^{Gag}$ levels. The red box highlights $Pr55^{Gag}$ level in PIP5K1α-depleted cells. (B) $Pr55^{Gag}$ release in the supernatant was assessed using an anti-p24 ELISA 48 h post transfection. The histogram shows the mean and SEM of p24 concentration (ng/ml) in the supernatants of cells left untreated (white bars) or treated with MG132 (gray bars) in three independent experiments.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

(C) $Pr55^{Gag}$ release efficiency was calculated as described in Materials and Methods, in three independent experiments. This histogram shows the $Pr55^{Gag}$ release efficiency of transfected TZM-bl HeLa cells left untreated (white bars) or treated with MG132 (gray bars), expressed as percentage compared to control cells transfected with the non-targeting siRNA. Mann-Whitney tests were performed to assess the significance of differences. Significant results (**** p value < 0.0001; ***, 0.0001 < p value < 0.001, ns = not significant) are indicated.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

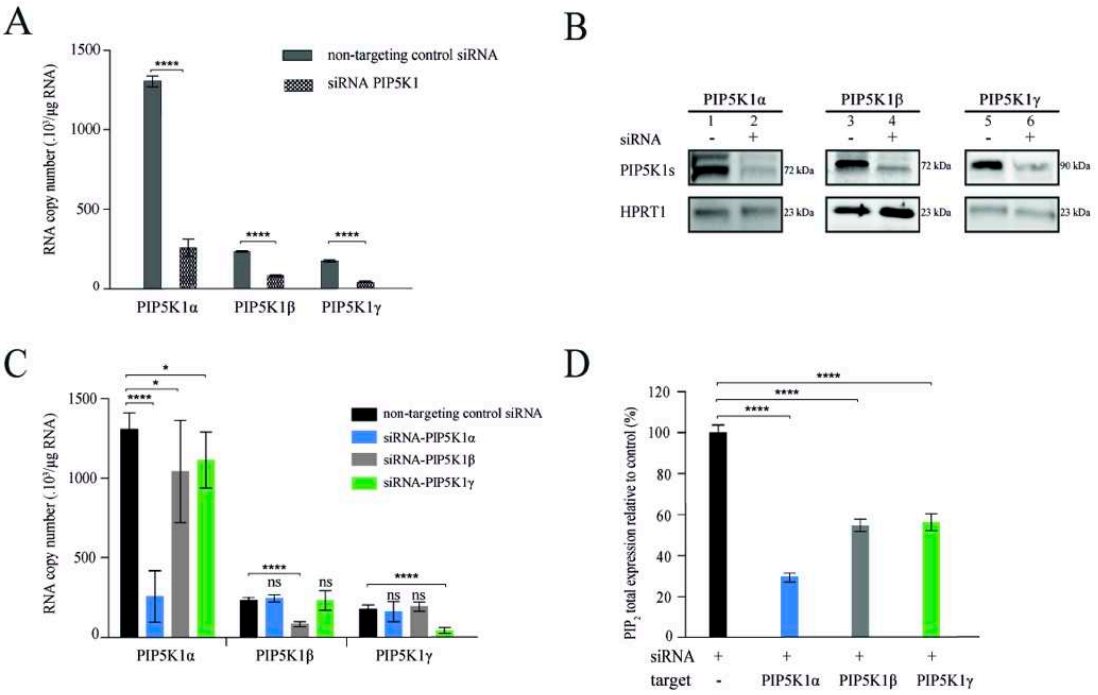


FIG. 1. The silencing of PIP5K1 isoforms decreases PI(4,5)P_2 production.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

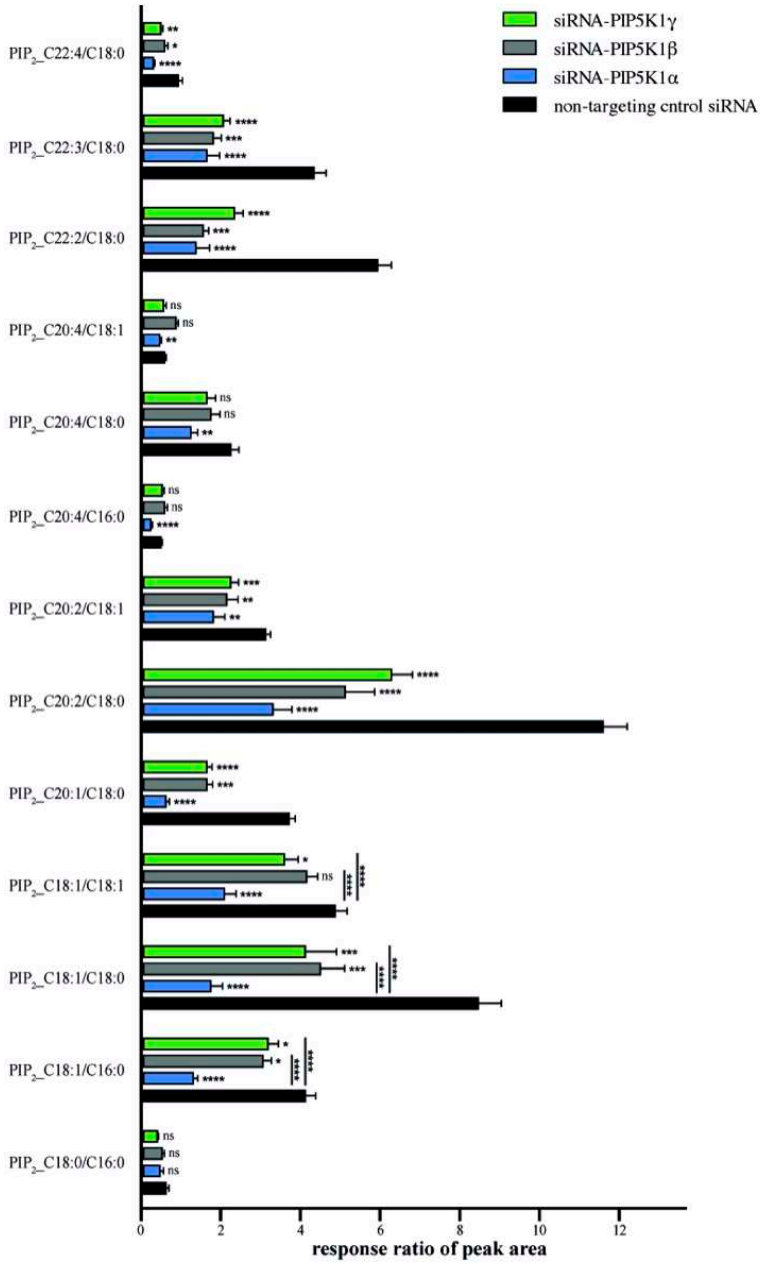


FIG. 2. The knockdown of PIP5K1 isoforms has various effects on the distribution of PI(4,5)P_2 species.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

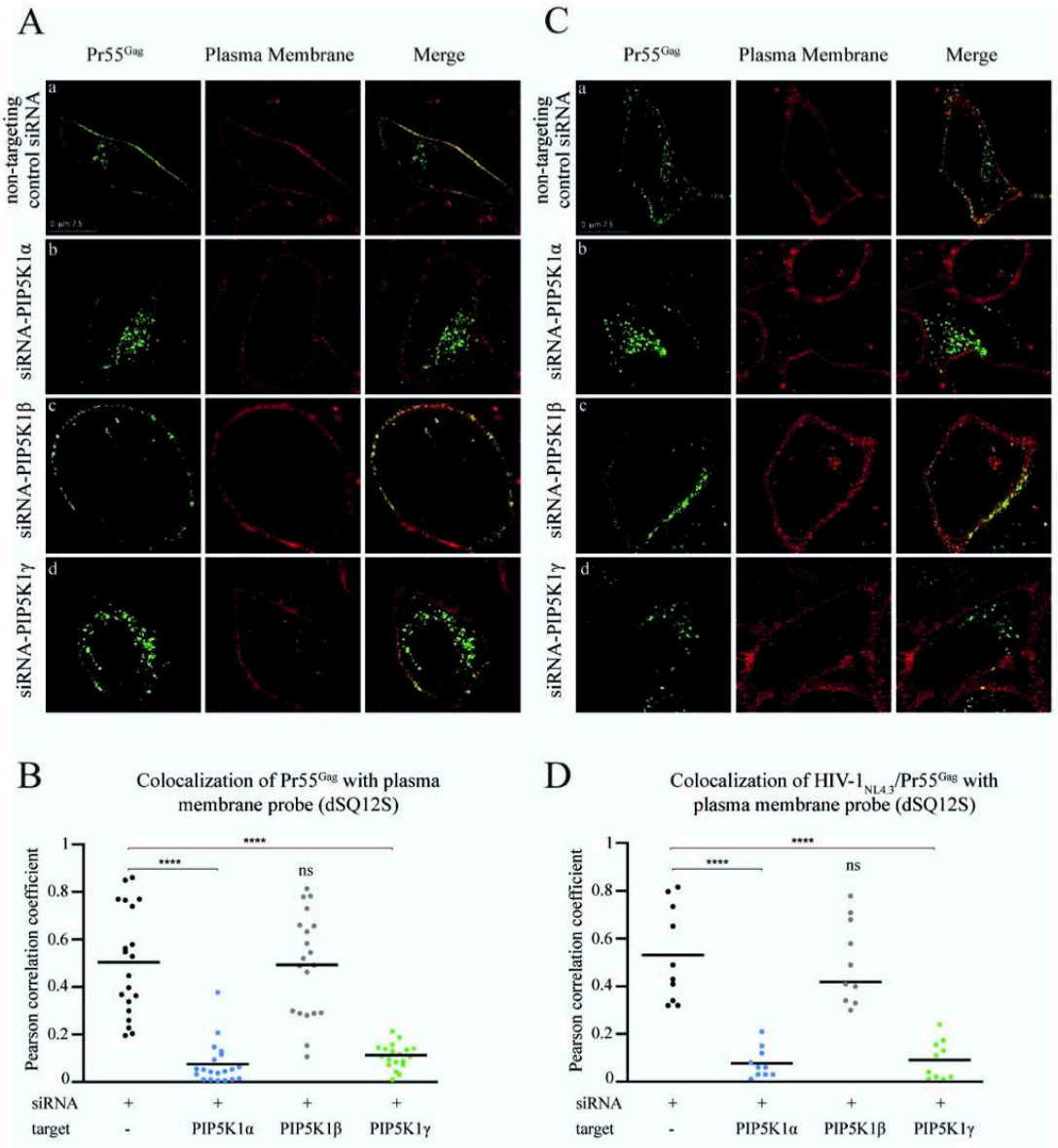


FIG. 3. The knockdown of PIP5K1α and PIP5K1γ impairs HIV-1 Pr55^{Gag} localization to the plasma membrane.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

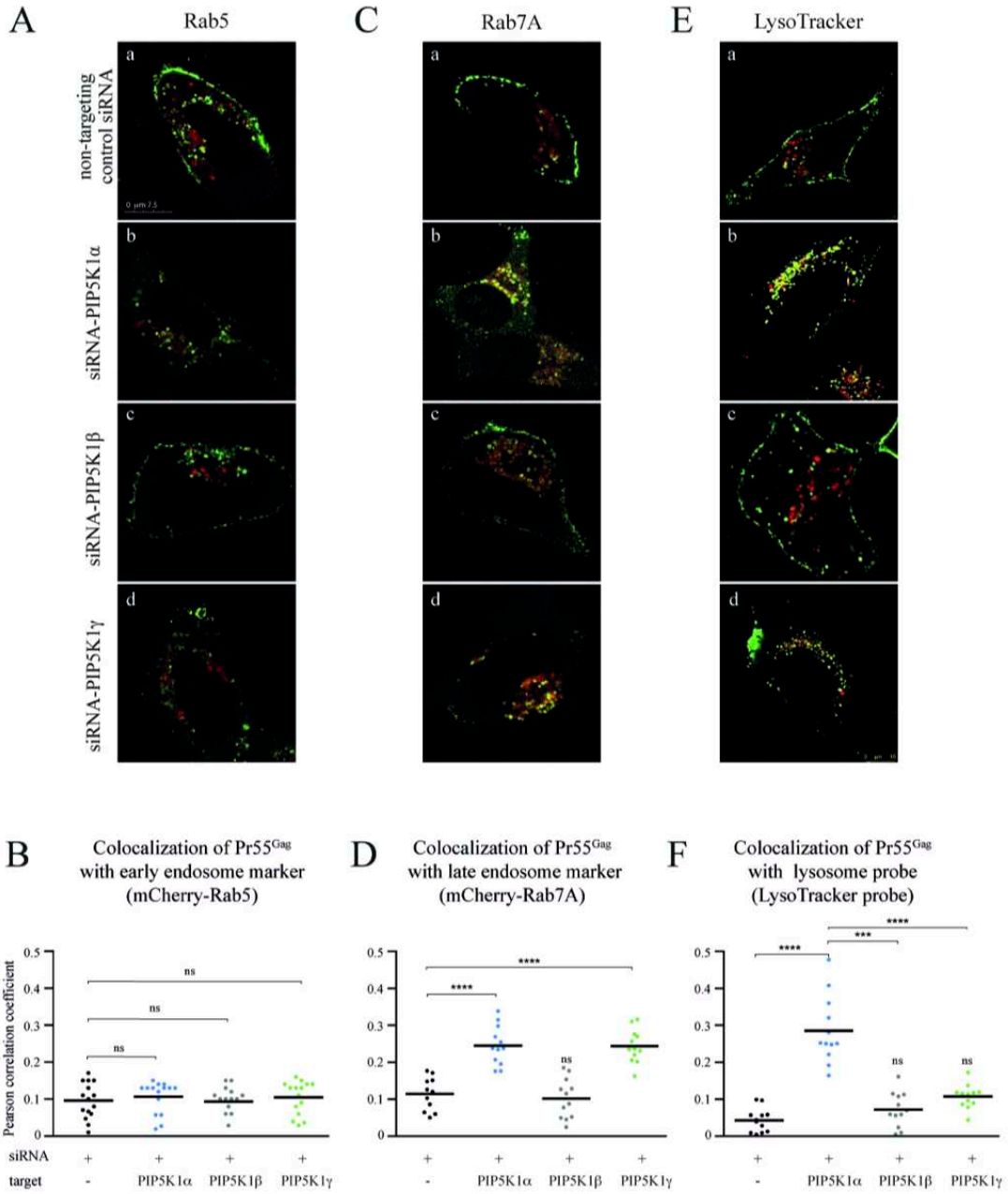


FIG. 4. The silencing of PIP5K1α and PIP5K1γ has different effects on the retargeting of HIV-1 Pr55^{Gag} to endosomal pathways.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Accepted Manuscript Posted Online
Journal of Virology
JVI
Journal of Virology

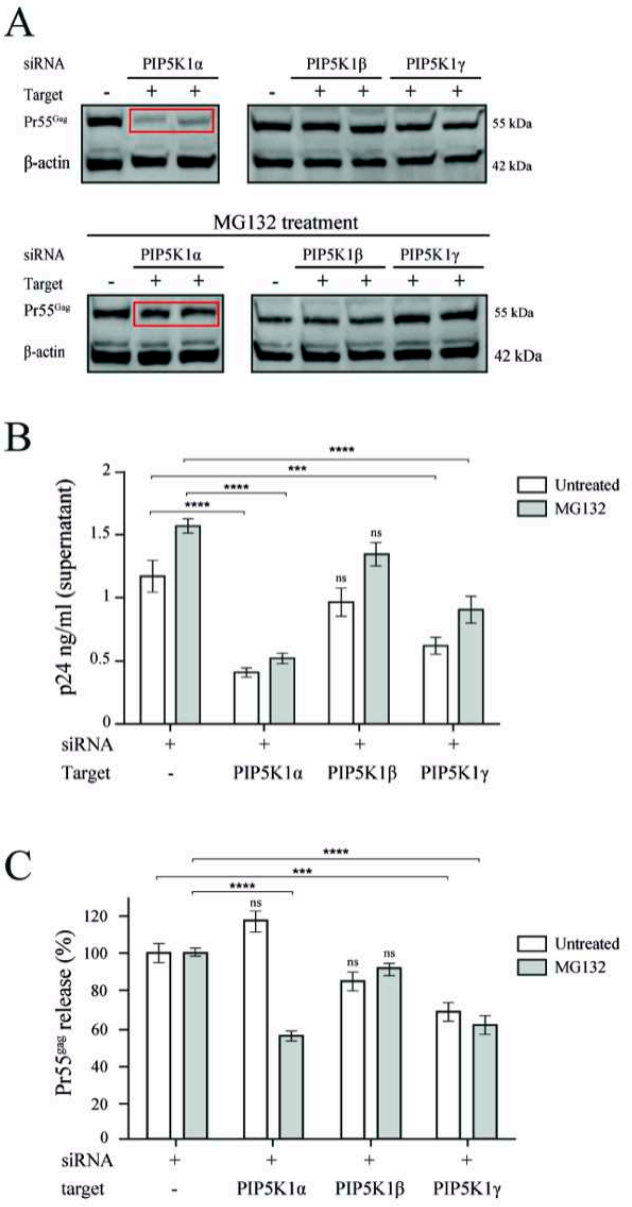


FIG. 5. Silencing of PIP5K1α and PIP5K1γ impairs Pr55^{Gag} targeting to PM and release into the cell supernatant.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on June 8, 2020 at INSERM

Stéphanie DURAND

Suivi et localisation en milieu cellulaire des complexes formés entre la protéine Gag du VIH-1 et l'ARN génomique par microscopie électronique à transmission

Résumé

Durant l'assemblage du VIH-1, les protéines Gag recrutent l'ARN génomique (ARNg) pour former de petits complexes nucléoprotéiques qui s'accumulent progressivement la membrane plasmique de la cellule infectée où de nouvelles particules virales sont formées.

Les travaux réalisés durant ma thèse ont permis de suivre et de localiser spatiotemporellement Gag et l'ARNg par microscopie électronique à transmission. Nos résultats suggèrent que Gag et l'ARNg forment des complexes dans le cytoplasme puis migrent en direction de la membrane plasmique où des virus contenant environ un quart d'ARNg sont formés. Une analyse quantitative des complexes démontre que la distance entre Gag et l'ARNg diminue durant leur transport vers la membrane plasmique et est corrélée dans certains cas à une augmentation de l'ARNg encapsidé. Des mutations ponctuelles dans les doigts de zinc de la NC augmentent les distances entre Gag et l'ARNg et diminuent l'ARNg encapsidé. La délétion du domaine SL1 de l'ARNg n'empêche pas l'encapsidation du génome viral tandis que la délétion des domaines SL1 et SL3 est suffisante pour altérer la formation des complexes et l'encapsidation de l'ARNg. Enfin, la formation de ces complexes est indépendante de la capacité de Gag à s'ancrer dans les membranes et de la présence du domaine p6. Pour compléter nos travaux, diverses approches de microscopie corrélative ont été expérimentées afin de relier une colocalisation de Gag et de l'ARNg à l'ultrastructure cellulaire entourant ces complexes.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux ont permis de détecter à haute résolution la formation de complexes nucléoprotéiques lors de l'assemblage du VIH-1 de suivre finement leur évolution spatio-temporelle. Cette étude fourni une vision supplémentaire du processus d'assemblage viral en milieu cellulaire.

Mots-clés : VIH-1, Assemblage, Gag, ARN génomique, Microscopie Électronique à Transmission

Résumé en anglais

HIV-1 Gag proteins kick-start virus assembly upon binding to the viral genomic RNA (gRNA), causing the formation of low-order oligomeric nucleoprotein complexes that will gradually accumulates at the plasma membrane of the infected cell to form new viral particles.

In this study, the intracellular localization of these complexes was tracked and followed by transmission electron microscopy. Gag-gRNA complexes are detected in the cytoplasm and then moved towards the plasma membrane where viral particles containing one quarter of gRNA are formed. A quantitative analysis of these complexes show that during their transport to the plasma membrane, the distance between Gag and gRNA decreases together with an increase of gRNA packaging. Point mutations in the GagNC zinc fingers caused an increase in the distance between Gag and the gRNA together with a large decrease of the packaged gRNA into virions. Conversly, deletion of the gRNA-SL1 does not interfere with gRNA packaging while deletion of SL3 is sufficient to decrease but not abolish Gag-gRNA cluster formation and gRNA packaging. Moreover, the formation of these complexes is neither dependant of Gag abilty to anchor in the plasma membrane nor of p6 presence. Finaly, correlative microscopy have been used to link a colocalisation phenotype between Gag and gRNA with the surrounding cell ultrastructure.

In conclusion, this work allow a spatiotemporal high resolution detection of nucleoproteic complexes during HIV-1 assembly and bring a supplementary view of HIV- 1 assembly.

Key words: HIV-1, Assembly, Gag, gRNA, Transmission Electron Microscopy