



## ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549

### Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Hugues de Rocquigny  
Unité : U966  
Equipe (*si unité multi-équipes*):  
Email de l'encadrant : hderocquigny@unistra.fr

Co-encadrant éventuel :

**Titre de la thèse : Suivre et localiser en milieu cellulaire l'interaction entre la protéine Gag du VIH et ses partenaires lors de l'assemblage des virus.**

### Résumé :

Le VIH-1 est un rétrovirus enveloppé qui possède deux brins d'ARN (+) encapsidés dans la particule sous forme dimérique. Au cours du cycle répliatif, cet ARN (+) est aussi un ARN messager qui est traduit pour donner naissance à la polyprotéine de structure Gag. Cette protéine, est constituée de quatre sous domaines, la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC) et la p6 (Sundquist et al 2012). Gag orchestre l'assemblage de la particule virale via la formation de petits oligomères qui se polymérisent sur l'ARN viral puis qui s'ancrent dans les membranes lipidiques après myristylation de sa partie N terminale. Ce modèle d'assemblage de la particule est maintenant bien décrit. **Cependant, la localisation cellulaire abritant l'oligomérisation de Gag et les interactions entre Gag et ses différents partenaires viraux ou cellulaires restent totalement inconnus (Kaddis Maldonado et al 2016).** Nos premiers travaux ont pu montrer que l'oligomérisation de Gag commençait dans le cytoplasme, que le domaine NC était indispensable à la cinétique de formation de ces oligomères et que le trafic intracellulaire de ces oligomères n'entraînait pas de modification profonde de leur organisation spatiale (El Meshri et al, 2015). Néanmoins, ces données en milieu cellulaire ont été obtenues essentiellement par calcul du FRET grâce à une approche de FLIM. Cette technique d'imagerie permet de suivre la formation spatio-temporelle d'un complexe macromoléculaire mais reste limitée par sa résolution optique qui ne permet pas d'identifier avec précision les domaines cellulaires abritant la formation des complexes.

**Objectif de la thèse :** Le but est de pouvoir détecter et localiser la protéine Gag du VIH dans la cellule par microscopie optique puis d'identifier l'ultrastructure cellulaire par une détection EM permettant l'accès à l'ultrastructure cellulaire (méthode CLEM pour Correlated Light and Electron Microscopy).

### **Ce programme va se dérouler principalement en trois étapes :**

- *Développer la technique du CLEM.* La protéine miniSOG possède des propriétés de fluorescence mais est capable, en présence de polymères osmiophiles, de former des structures denses aux électrons (Shu et al, 2011). Cette construction sera placée entre MA et CA suivant le modèle utilisé avec l'eGFP (Muller et al, 2004). Les cellules, transfectées par cette construction, seront suivies par FRET grâce au microscope confocal LEICA TCS SP8 puis observées en microscopie électronique. Le renouvellement en 2017 d'un des deux microscopes électroniques à transmission de la plateforme IBiSA de ME, adossée à notre

unité, permettra d'effectuer ce type d'approche avec un microscope de nouvelle génération particulièrement performant.

- *Etablir une corrélation entre assemblage de Gag et localisation subcellulaire.* Les mutations porteront sur des résidus impliqués dans l'oligomérisation de Gag (CA), sur l'interaction de Gag avec les membranes (MA) et/ou les acides nucléiques (NC).
- *Identifier la formation des complexes entre Gag et ses partenaires lors de l'assemblage.* La protéine Gag interagit avec de nombreux partenaires viraux (Vif, Vpr, ARN génomique) et cellulaires (Alix, TSG101, VPS4, RPL7...) mais la localisation de ces interactions reste peu connue. Nous disposons des constructions les exprimant sous forme de protéines chimériques décorées de marqueurs fluorescents et l'utilisation de la CLEM nous permettra d'identifier les structures cellulaires abritant ces interactions. Ces travaux seront complétés par l'utilisation de marqueurs spécifiques des organites cellulaires.

Ref :

Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jul;2(7):a006924. doi: 10.1101/cshperspect.a006924.

Kaddis Maldonado R, Parent L. Orchestrating the Selection and Packaging of Genomic RNA by Retroviruses: An Ensemble of Viral and Host Factors. Viruses. 2016 Sep 20;8(9). pii: E257.

El Meshri SE, Dujardin D, Godet J, Richert L, Boudier C, Darlix JL, Didier P, Mély Y, de Rocquigny H. Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. J Mol Biol. 2015 Mar 27;427(6 Pt B):1480-94. doi: 10.1016/j.jmb.2015.01.015. Epub 2015 Jan 30.

Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, Jin Y, Ellisman MH, Tsien RY. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. PLoS Biol. 2011 Apr;9(4):e1001041. doi: 10.1371/journal.pbio.1001041. Epub 2011 Apr 5.

Müller B1, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Kräusslich HG. Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. J Virol. 2004 Oct;78(19):10803-13.

Abd El-Wahab EW, Smyth RP, Mailler E, Bernacchi S, Vivet-Boudou V, Hijnen M, Jossinet F, Mak J, Paillart JC, Marquet R. Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. Nat Commun. 2014 Jul 2;5:4304. doi: 10.1038/ncomms5304.

Anton H, Taha N, Boutant E, Richert L, Khatter H, Klaholz B, Rondé P, Réal E, de Rocquigny H, Mély Y. Investigating the cellular distribution and interactions of HIV-1 nucleocapsid protein by quantitative fluorescence microscopy. PLoS One. 2015 Feb 27;10(2):e0116921. doi:10.1371/journal.pone.0116921. eCollection 2015.

Mekdad H, Boutant E, Karnib H, Biedma ME, Sharma KK, Malyska I, Laumond G, Roy M, Réal E, Paillart JC, Moog C, Darlix JL, Mély Y, de Rocquigny H. 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. 2016 Aug 11;13(1):54. doi: 10.1186/s12977-016-0287-4.

Ueno T, Kaneko K, Sata T, Hattori S, Ogawa-Goto K. Regulation of polysome assembly on the endoplasmic reticulum by a coiled-coil protein, p180. Nucleic Acids Res. 2012 Apr;40(7):3006-17. doi: 10.1093/nar/gkr1197. Epub 2011 Dec 7.

## Résumé en anglais :

*In cellulo* tracking and localization of the interactions between HIV-1 Gag and viral and cellular partners during the viral assembly.

**Summary:** HIV-1 is a retrovirus containing a (+) strand genomic RNA encapsidated as a dimer that is also translated into a structural protein, giving rise to the Gag polyprotein. This protein, consists of four sub-domains, the matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC) and p6 (Sundquist et al 2012). Gag orchestrates the assembly of the viral particle through the formation of small oligomers that polymerize on the viral RNA which results anchoring of Gag to the lipid membranes, post-myristoylation. Although, this model of assembly is well characterized, still the mechanism by which Gag specifically recognize its viral or cellular partners and the localization of these complexes remain elusive. Previous results from us and others have demonstrated a few Gag mechanism-related properties: 1) formation of Gag oligomers is initiated in the cytoplasm, 2) the NC domain is essential for the kinetic of Gag oligomerization and 3) the intracellular trafficked Gag oligomers to the plasma membrane does not cause substantial modification of their spatial organization (El Meshri et al, 2015). However, these data were obtained by calculating the FRET between fluorescently labelled Gag using FLIM. Although, this imaging approach reports the spatial and temporal formation of a

macromolecular complex, still remains limited by its optical resolution. And this limitation precludes the identification of the cell areas, which are housing the complex formation.

**Aim of the thesis:** The aim is to detect and locate Gag in the cell by improved optical microscopy and identifying sites of the localization by EM detection, allowing access to the cellular ultrastructure (CLEM pour Correlated Light and Electron Microscopy).

**This program will be developed in three stages:**

- *Development of the CLEM technique.* MiniSOG protein has fluorescence properties and is able, in the presence of osmiophilic polymers, to form dense electron structures (Shu et al, 2011). This construction will be placed between MA and CA following the model used with eGFP (Muller et al, 2004). Cells transfected with these constructs will be followed by FRET using the confocal microscope Leica TCS SP8 then observed by electron microscopy. Interestingly, the renewal in 2017 of one of the two transmission electron microscopes (IBiSA platform ME), leaned in our unit, will allow this research to be performed using the state of the art in term of EM.
- *Establish a correlation between assembly and subcellular localization.* Mutations will be centered on residues involved in the oligomerization of Gag (CA), in the interaction between Gag and membrane (MA) and between Gag and nucleic acids (NC).
- *Identify the cellular localization of the viral Gag and its partner's.* Gag is known to interact with many viral (Vif, Vpr, genomic RNA...) and cellular (Alix, TSG101, VPS4, RPL7...) partners but sites of interaction remain elusive. A series of plasmids expressing chimera proteins decorated by various fluorescent tags will be expressed and observed by CLEM to localize and identify cellular structure housing these interactions. In addition, specific markers will be used to identify cellular organelles.