

## **SOUMISSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ**

### **UNITÉ :**

UMR CNRS 7213

### **EQUIPE**

Intitulé de l'équipe : Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie UMR CNRS 7213 – Equipe 1

Responsable de l'équipe: Prof. Yves Mély

E-mail : Yves.mely@unistra.fr

Téléphone : 03 68 85 42 63

Site web éventuel : www-lbp.unistra.fr/

### **COMPOSITION DE L'ÉQUIPE**

Nombre de chercheurs : 13

Nombre de ITA : 3

Nombre de doctorants : 12

Nombre de post-docs : 1

Autres : /

### **CONCERNANT LA THÈSE**

Nom du Directeur de thèse : Yves Mely

Mail du Directeur de thèse : Yves.mely@unistra.fr

Téléphone : 0368854263

Thèse en co-encadrement *oui*

Thèse en co-direction *oui*

Thèse en co-tutelle *non*

Nombre de thèses en cours pour le Directeur de thèse :

En cas de co-direction, co-encadrement ou co-tutelle :

Nom du co-directeur/encadrant : Christian Boudier/Emmanuel Boutant

Université du co-directeur/encadrant : Université de Strasbourg

Nombre de thèses en cours pour le co-directeur/encadrant : 0

### **THÈSE(S) EN COURS POUR LE DIRECTEUR DE THÈSE**

Nombre de thèses en cours : 7 (dont 3 vont soutenir d'ici moins de 6 mois)

Pour chaque doctorant en cours :

Nom :Kovalenko

Prénom : Lesia

Début de la thèse : 01/09/13

Fin prévisionnelle : Avril 2017

Co direction Olga Zaporozhets

Nom :Pires

Prénom : Manuel

Début de la thèse : 15/10/13

Fin prévisionnelle : Soutenance le 17 mars 2017

Co direction Hugues de Rocquigny

## SOUSSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ

Nom : Lysova  
Prénom : Iryna  
Début de la thèse : 01/10/13  
Fin prévisionnelle : Soutenance Juin 2017  
Co tutelle Igor Dmitruk

Nom : Sharma  
Prénom : Rajhans  
Début de la thèse : 15/10/14  
Fin prévisionnelle : Novembre 2017

Nom : Sych  
Prénom : Taras  
Début de la thèse : 01/09/14  
Fin prévisionnelle : Septembre 2017  
Co direction Winfried Roemer (Etudiant Programme doctoral International)

Nom : Dukhno  
Prénom : Oleksii  
Début de la thèse : 01/09/15  
Fin prévisionnelle : Septembre 2018

Nom : Muhammad  
Prénom : Faisal Nadeem  
Début de la thèse : 01/09/15  
Fin prévisionnelle : Septembre 2018

### DOCTEURS ISSUS DE L'ÉQUIPE (durant les 5 dernières années)

Nombre de docteurs issus de l'équipe (max 3) :

Nom du docteur : Sholokh  
Prénom du docteur : Marianna  
Date de soutenance : 12/07/2016  
Situation actuelle : Chef de projet chez Delpharm

Nom du docteur : Kilin  
Prénom du docteur : Vasyi  
Date de soutenance : 26/06/2016  
Situation actuelle : Post-doctorant à Genève

### CONCERNANT LE SUJET PROPOSÉ

**Titre :** *Etude de l'interaction entre la protéine virale du VIH-1 Gag et l'ARN génomique*

**Projet :** *(max 3990 caractères espaces compris, pas de caractères spéciaux)*

Le SIDA reste, malgré les progrès des multi-thérapies, un important problème de santé publique. Le virus de l'immunodéficience de type-1 (VIH-1) responsable de cette maladie pandémique est un rétrovirus enveloppé possédant un génome d'ARN de polarité positive codant pour trois polyprotéines majeures : Gag, Pol et Env ainsi que pour des protéines régulatrices et auxiliaires. Cet ARN viral (ARNg) possède une région unique en 5'UTR non traduite fortement structurée où

## **SOUMISSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ**

l'on retrouve le signal d'encapsidation ( $\psi$ ). Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la protéine NCp7 sous forme de protéine mature ou de domaine au sein du précurseur Gag. L'implication du domaine NC dans le recrutement spécifique de l'ARNg n'est plus à démontrer. Cependant, les mécanismes régulant cette spécificité de reconnaissance du domaine  $\psi$  sont encore peu définis. En effet, le VIH encapside dans ses particules virales uniquement deux copies de l'ARNg alors qu'environ 2000 copies de Gag sont présentes. Ainsi, le but de ce projet est d'utiliser les technologies d'imagerie avancées disponibles au laboratoire afin de caractériser et comprendre au niveau cellulaire comment les domaines NC et  $\psi$ , respectivement de Gag et de l'ARNg, permettent une sélection spécifique de l'ARN viral malgré la présence de multiples ARN cellulaires ou viraux épissés dans le cytoplasme. Afin de visualiser l'ARN du VIH-1, nous utilisons un ARNg modifié composé de tiges boucles du bactériophage MS2 capables d'être reconnues par la protéine de capsid du même phage fusionnée à l'eGFP (MS2-eGFP). Nous pouvons ainsi suivre *ex vivo* l'ARN viral fluorescent et sa localisation/interaction avec Gag au niveau cellulaire. Les premiers résultats démontrent une interaction Gag-ARNg initiée au niveau cytoplasmique avant un adressage vers la membrane plasmique. L'implication des doigts de zinc du domaine NC de Gag semble déterminante dans ce recrutement.

Le projet de thèse proposé débutera par la finalisation de l'étude portant sur l'implication des doigts de zinc du domaine NC dans l'interaction avec l'ARNg. Pour ce faire, l'étudiant sera amené à tester de nombreux mutants ponctuels au niveau des doigts de zinc afin de définir quels acides aminés sont nécessaires au recrutement. Ces études seront réalisées par observation phénotypique des colocalisations de l'ARN fluorescent et des protéines Gag mutées par microscopie confocale et TIRF (microscopie de fluorescence par réflexion totale interne). L'interaction sera analysée ensuite au niveau de la membrane et du cytoplasme, par imagerie en temps de vie FLIM de l'eGFP. Cette étude d'interaction sera complétée par des analyses de FCS qui nous permettront d'obtenir des informations sur la diffusion et la stœchiométrie des complexes ARNg-Gag. Enfin, nous validerons à l'échelle nanoscopique la présence des partenaires d'interaction au sein de complexes individuels par imagerie super résolutive PALM et STORM. Ainsi, cette première partie du projet permettra au doctorant de se familiariser aux techniques d'imagerie de pointe employées au laboratoire avec les protéines/outils cellulaires mis à sa disposition. Le deuxième volet du projet de thèse portera sur l'étude du domaine  $\psi$  responsable de l'interaction avec Gag. Cette partie développera les compétences en biochimie, biologie moléculaire de l'étudiant recruté car il participera activement au clonage de mutants du domaine  $\psi$  de l'ARNg en se focalisant sur les tiges boucles 1 et 3 de la région 5'UTR avant d'étudier la colocalisation/interaction/suivi spatio-temporel des complexes fluorescents en utilisant les techniques d'imagerie définies précédemment.

L'ensemble de ces expériences permettra de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans les phases tardives d'assemblage du virus, ce qui pourra servir à l'élaboration de thérapies ciblées et innovantes.

**Compétences souhaitées :** *(max 590 caractères, espaces et sauts de lignes compris)*

*Formation initiale en biologie cellulaire et moléculaire souhaitée*

**Expertises qui seront acquises au cours de la formation :** *(max 590 caractères, espaces et sauts de lignes compris)*

*Biologie cellulaire, transfection, microinjection*

## **SOUSSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ**

*Biologie moléculaire (clonage, PCR)*

*Biochimie (immunoprécipitation, western blot...)*

*Microscopie (confocale/vidéo microscopie/FCS/ super résolution/ FRET-FLIM)*

**Mot clé** (servira pour la consultation des sujets) : *(max 40 caractères, espaces compris)*

*VIH – Gag – ARN -microscopie*

### **PUBLICATIONS MAJEURES DE L'ÉQUIPE RELATIVES AU SUJET AU COURS DES 3 DERNIÈRES ANNÉES. SI NOUVEAU SUJET SANS PUBLICATION, MERCI D'INDIQUER 3 PUBLICATIONS RÉCENTES DU DIRECTEUR DE THESE.**

1) H. EL MEKDDAD, E. BOUTANT, H. KARNIB, M.E. BIEDMA, K.K SHARMA, I. MALYTSKA, G. LAUMOND, M. ROY, E. REAL, J.C. PAILLART, C. MOOG, J.L. DARLIX, Y. MELLY, & H. de ROCQUIGNY. 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, 13, 54.

2) S.E. EL MESHRI, D. DUJARDIN, L. RICHERT, C. BOUDIER, J. GODET, J.L. DARLIX, P. DIDIER, Y. MELLY\*, & H. de ROCQUIGNY\*. Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *J. Mol. Biol.*, 2015, 427, 1480-94.

3) N. KEMPF, V. POSTUPALENKO, S. BORA, P. DIDIER, Y. ARNTZ, H. de ROCQUIGNY, & Y. MELLY. The HIV-1 nucleocapsid protein recruits negatively charged lipids to ensure its optimal binding to lipid membranes. *J Virol.*, 2015, 89, 1756-67.

### **CONTRATS DE L'ÉQUIPE** *(max 140 caractères, espaces et sauts de lignes compris)*

Contrat européen THINPAD, SANOFI PASTEUR, SHIONOGI, ANR (PICO 2), LABEX NIE, PROJET INNOVATION FRC

### **Partie à rédiger en anglais :**

#### **TOPIC**

**Title :** Study of the interaction between the HIV-1 structural protein Gag and the genomic RNA

**Project :** *(max 3990 caractères espaces compris, pas de caractères spéciaux)*

Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) is the causative agent of acquired deficiency syndrome, a worldwide pandemic disease. This enveloped retrovirus contain two copies of genomic RNA (gRNA) encoding for three major polyproteins: Gag, Pol and Env and regulatory and auxiliary proteins. During HIV-1 assembly, Gag is required for the specific selection, encapsidation and packaging of the gRNA via the binding to the  $\psi$  domain that comprises four closely spaced stem loops (SL1-4) located within the 5' untranslated region of the gRNA. This binding promotes Gag oligomerization and targeting to the plasma membrane.

The structural protein Gag is composed of four domains: the matrix, the capsid the nucleocapsid (GagNC) and p6 contributing to the late phase of HIV-1 replication (budding and egress). The GagNC domain is responsible for the selective packaging of gRNA, but the mechanism

## **SOUSSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ**

underlying this highly specific selection is not fully understood. Thus, the main goal of this study is to use advanced imaging techniques to further characterize the roles of the NC domain and the  $\psi$  domain of genomic RNA in the assembly process of HIV-1. To monitor the localization/interaction of HIV-1 Gag with genomic RNA (gRNA) in cells (*ex vivo*), we implemented in the lab the well-known MS2 technology using DNA constructs encoding gRNA tagged with 12 stem loops that bind specifically to the coat protein of the bacteriophage MS2 labeled with eGFP (MS2-eGFP) in the presence or absence of fluorescently labeled Gag. Our first results show that Gag interacts with the gRNA in the cytoplasm before accumulating at the plasma membrane. The two zinc fingers of GagNC appear crucial for gRNA packaging.

In a first step, the objective of this PhD project will be to further characterize the involvement of GagNC zinc fingers by testing different point mutants in order to decipher which amino acids of NC are mandatory for gRNA recruitment. To do so, the student will evaluate the different localization phenotypes of Gag-mCherry mutants with the labelled gRNA-MS2-eGFP by using confocal and Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy. Direct interaction between Gag-mCherry (WT and mutants) and MS2-eGFP-gRNA complexes will be then investigated by FRET-FLIM at the plasma membrane and in the cytoplasm. Moreover, to further image these interactions at high resolution, the student will use the super resolution techniques STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) and PALM (Photo-activated localization microscopy) developed in the lab. This will open the way to nanoscale mapping of protein interactions in living cells. In parallel, Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and Raster Image Correlation Spectroscopy (RICS) approaches will be performed to measure the diffusion and brightness of the complexes formed by Gag and viral (spliced and unspliced) RNA in the cytoplasm. These techniques will inform us about the stoichiometry of the labeled partners within the diffusing complexes. Moreover, to further characterize the gRNA determinants mediating the interaction, gRNA mutants will be used. Thus, gRNA lacking elements for Gag binding (point mutations and deletion mutations, mostly focused on SL1 and SL3 of the 5'UTR) will be tested. To realize this part of the project, the PhD will develop new biochemistry tools (gRNA mutants). Our *ex vivo* imaging (confocal/ TIRF/ FRET-FLIM/FCS and RICS) data will be validated by immunoprecipitation of one member of the MS2-gRNA/Gag complex and co-immunoprecipitation of the other members by quantitative RT-qPCR and western blot, respectively. Altogether, these data should allow us to better understand the mechanisms of the late assembly steps, which could in turn provide some clues for new therapeutic strategies.

**Wished skills :** (*max 590 caractères, espaces et sauts de lignes compris*)

*Basic knowledge in cell and molecular biology*

**Expertises which will be acquired during the training :** (*max 590 caractères, espaces et sauts de lignes compris*)

*Cell biology, transfection, microinjection*

*Molecular Biology (cloning, PCR)*

*Biochemistry (immunoprecipitation, western blot...)*

*Microscopy (confocal/video microscopy/FCS/ super resolution/ FRET-FLIM)*

**Key word :** (*max 40 caractères, espaces compris*)

## **SOUMISSION D'UN SUJET DE THÈSE – ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ**

HIV, Gag, RNA, microscopy

Commentaires éventuels pour l'Ecole Doctorale (*max 590 caractères, espaces et sauts de lignes compris*)  
Trois des étudiants en thèse (M. Pires, I. Lysova, L. Kovalenko) vont soutenir très bientôt. Les deux premiers ont déjà rédigé leur thèse et quitté le laboratoire. La soutenance de M. Pires est planifiée le 17 mars 2017 et celle de L. Kovalenko et I. Lysova devront intervenir en avril et juin 2017. Par ailleurs, Taras Sych en co-tutelle avec W Roemer à Fribourg a déjà passé l'intégralité de son séjour au labo et travaille désormais à Fribourg. Je n'encadre donc plus que 3 étudiants à ce jour.