

Université de Montréal

**Caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine
Rev de lentivirus.**

par Claude Marchand

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Virologie et Immunologie

Mai 2020

© Claude Marchand, 2020

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Caractérisation des domaines fonctionnels de la
protéine Rev de lentivirus.**

Présentée par : Claude Marchand

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Carolina Alfieri, Ph.D. Présidente-rapporteur

Dr Guy Lemay, Ph.D. Directeur de recherche

Dr Denis Archambault, Ph. D. Co-directeur de recherche

Dr Carl A. Gagnon, Ph.D. Membre du jury

Dr Angela Pearson, Ph D. Membre externe

Dr Sébastien Talbot, Ph.D. Représentant du doyen

Résumé

Dans la cellule, les ARN pré messagers contenant des introns sont normalement retenus au noyau par leur interaction avec des facteurs d'épissage. Cependant, les ARN partiellement et non épissés des rétrovirus doivent entrer dans le cytoplasme pour servir de matrice pour la synthèse de certaines protéines telles que Env, Gag et Gag-Pol ainsi que d'ARN génomique qui sera empaqueté dans les nouveaux virions. Un mécanisme post-transcriptionnel utilisé par les lentivirus pour éviter la séquestration nucléaire de ces ARNm dépend d'une protéine virale appelée Rev. Pour assurer sa fonction d'exportation, Rev doit transiter entre le noyau et le cytoplasme et doit aussi pouvoir former des multimères. Par conséquent, Rev est dotée de domaines fonctionnels lui procurant ces habiletés. On retrouve le domaine riche en arginines qui contient le domaine de liaison à l'ARN et le signal de localisation nucléaire (NLS), un second domaine, riche en leucines, porte le signal d'exportation nucléaire (NES) et finalement le domaine de multimérisation. Bien que les protéines Rev du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et bovine (VIB) aient été caractérisées, aucune étude n'a été réalisée pour la protéine Rev du virus de la maladie de Jembrana (JDV) et très peu sur le virus de l'immunodéficience féline (VIF). Comme les domaines fonctionnels et la voie d'importation des protéines Rev déjà caractérisées sont différents, nous supposons que chaque protéine Rev possède une organisation qui lui est propre et que les mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique diffèrent entre les virus. Ce projet a pour objectif de caractériser ces domaines pour la protéine Rev du JDV et ceux du VIF ainsi que les mécanismes permettant leur transport nucléaire. L'utilisation de mutants de la protéine Rev de ces virus couplés à la protéine de fluorescente verte (EGFP) exprimés dans des cellules appropriées et observés par microscopie a permis d'identifier des séquences NLS et NES différentes de celles déjà caractérisées. Le

NLS de la protéine Rev du JDV a été identifié et est composé des résidus arginines de la séquence 76-RRPARRPPIRR-87 avec un NoLS composé des mêmes résidus en plus des arginines R74, R103 et R104. Son NES est composé des résidus hydrophobes de la séquence 116-MAELEERFEDLAL-128 et est du type de l'inhibiteur de la protéine kinase (PKI pour « protéine kinase inhibitor »). Pour la protéine Rev du VIF, son NLS est composé des résidus basiques de la séquence 84-KKKRQRRRRKKKAFKK-99. Le NoLS est composé des mêmes acides aminés en plus du résidu K82. De plus, les essais d'importation nucléaires et d'interaction semblent indiquer que les voies d'importation utilisées diffèrent entre les virus et que plusieurs voies peuvent être utilisées. Ces travaux pourront éventuellement servir de base pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre les lentivirus.

Mots-clés : Lentivirus, Rev, multimérisation, NLS, NES, virus de la maladie de Jembrana, virus de l'immunodéficience féline, transport nucléo-cytoplasmique.

Abstract

In the cell, pre-messenger RNAs containing introns are normally retained in the nucleus by their interaction with splicing factors. However, the partially and unspliced RNAs of retroviruses must enter the cytoplasm to serve as a template for the synthesis of certain proteins such as Env, Gag and Gag-Pol as well as genomic RNA to be packaged in the new virions. A post-transcriptional mechanism used by lentiviruses to prevent nuclear sequestration of these mRNAs depends on a trans-activator, the viral protein Rev. To ensure its export function, Rev must be able to shuttle between the nucleus and the cytoplasm and to form multimers. As a result, Rev has functional domains that provide these abilities: the arginine-rich domain, which contains the RNA binding domain and the nuclear localization signal (NLS), a second domain, rich in leucine, corresponding to the nuclear export signal (NES) and finally the multimerization domain. Although the Rev proteins of the human and bovine immunodeficiency virus (HIV-1 and BIV respectively) have been characterized, no studies have been performed for the Jembrana disease virus (JDV) Rev protein and very little on the feline immunodeficiency virus (FIV). Since the functional domains and import pathway of the already characterized Rev proteins are different, we assume that each Rev protein has its own organization and that the nucleo-cytoplasmic transport mechanisms differ between viruses. The goal of this project is to characterize these domains for the JDV and FIV Rev proteins as well as to elucidate mechanisms for their nuclear transport. The use of Rev mutants fused to the EGFP expressed in appropriate cells and observed by microscopy has identified NLS and NES sequences that differ from those already characterized. JDV Rev NLS is composed of arginine residues in the 76-RRPARRPPIRR-87 sequence with a NoLS composed of the same residues with the addition of arginine R74, R103 and R104. JDV Rev NES is composed of hydrophobic residues in the 116-

MAELEERFEDLAL-128 sequence and is of the protein kinase inhibitor type (PKI). For the FIV Rev protein, its NLS is composed of basic residues in the 84-KKKRQRRRRKKKAFKK-99 sequence. FIV Rev NoLS is composed of the same residues with the addition of the lysine at position 82. In addition, the nuclear import and interaction tests suggest that the import routes used by Rev differ between the different viruses studied and that more than one import pathway may be used. This work could serve as a basis for identifying new therapeutic targets against lentiviruses.

Keywords: Lentivirus, Rev, multimerization, NLS, NES, Jembrana disease virus, nucleo-cytoplasmic transport, Feline immunodeficiency virus.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles.....	xvi
Liste des abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxi
Introduction.....	1
Chapitre I. État des connaissances.....	3
1.1. Les lentivirus.....	3
1.1.1. Classification et généralités biologiques.....	3
1.1.2. Organisation génomique.....	5
1.1.3. Cycle de réplication.....	7
1.1.4. Les protéines accessoires et de régulation.....	11
1.2. Le virus de la maladie de Jembrana.....	13
1.2.1. Hôtes.....	14
1.2.2. Transmission.....	14
1.2.3. Tropisme.....	15
1.2.4. Pathologie et symptômes cliniques.....	15
1.2.5. Biologie moléculaire.....	17
1.2.6. Les protéines accessoires et de régulation.....	19
1.3. Le virus de l'immunodéficience féline.....	21
1.4. La protéine Rev.....	24

1.4.1. Domaines fonctionnels.....	24
1.4.2. Les différents rôles de la protéine Rev	27
1.4.3. Multimérisation de Rev et liaison au RRE	29
1.4.4 Les autres protéines Rev	31
1.5. Transport nucléaire	32
1.5.1. Importation nucléaire	33
1.5.2. Le signal de localisation nucléaire	35
1.5.3. Exportation nucléaire	36
1.5.4. Le signal d'exportation nucléaire.....	36
1.5.5. Rev et le nucléole.....	38
1.6. Hypothèses et objectifs	39
Chapitre II: Le virus de la maladie de Jembrana: identification de nouveaux signaux de localisation nucléaire/nucléolaire et d'exportation nucléaire chez les lentivirus...	41
2.1. Abstract.....	43
2.2. Introduction.....	44
2.3. Materials and methods	46
2.3.1. Cell cultures and transfection.....	46
2.3.2. Plasmid constructs encoding the JDV Rev WT and deletion mutant proteins.....	47
2.3.3. Fluorescence microscopy.....	48
2.3.4. CAT assay.....	49
2.3.5. SDS-PAGE and Western Blot analysis.....	50
2.3.6. Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay.....	50
2.3.7. Statistics	51
2.4. Results.....	52
2.5. Discussion	70
2.6. Acknowledgments.....	76
2.7 Supplementary Materials	76

Chapitre III: Identification des signaux de localisation nucléaire et nucléolaire de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience féline	81
3.1 Abstract	83
3.2. Introduction	84
3.3. Materials and methods	86
3.3.1. Cell cultures and transfection	86
3.3.2. Construction of FIV Rev WT and mutant proteins	86
3.3.3. Fluorescence microscopy	87
3.3.4. Analysis of transcriptional activity	88
3.3.5. Statistics	89
3.4. Results	89
3.4.1. Prediction of the FIV Rev protein NLS by computer analyses	89
3.4.2. The NLS of the FIV Rev protein is contained within a 20 amino acid region.	90
3.4.3. The FIV Rev protein NLS can direct the nuclear localization of heterologous proteins.	94
3.4.4. Identification of amino acids composing the FIV Rev protein NLS.	97
3.4.5. Identification of amino acids important for the nucleolar localization of the FIV Rev protein	100
3.5. Discussion	103
3.6. Acknowledgments	106
Chapitre IV: Importation nucléaire et interaction au nucléole de la protéine Rev du JDV et du VIF	107
4.1. Importation de Rev au noyau	107
4.1.1. Méthodes	109
4.1.2. Résultats	114
4.2. Partenaires d'interaction nucléolaires	123
4.2.1. Méthodes	123

4.2.2. Résultats.....	125
Chapitre V: Discussion générale.....	129
5.1. Le motif riche en arginine (ARM).....	129
5.1.1. Le NLS/NoLS.....	130
5.1.2. Le domaine de liaison à l'ARN (RBD).....	132
5.2. Le NES ou domaine effecteur.....	133
5.3. Le domaine de multimérisation.....	136
5.4. Organisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev des lentivirus...	138
5.5. Transport nucléo-cytoplasmique.....	140
5.5.1. Importines β	141
5.5.2. Importines α	142
5.5.3. Transportine.....	145
5.6. Interaction avec le nucléole.....	147
5.7. Perspectives.....	149
Conclusion.....	151
Bibliographie.....	i
Annexe A: La protéine B23/nucléophosmine interagit avec la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine et facilite la réplication virale.....	i
A.1. Abstract.....	ii
A.2. Introduction.....	ii
A.3. Results and discussion.....	v
A.3.1. BIV Rev interacts with B23 <i>in vivo</i>	v
A.3.2. Interaction between BIV Rev and B23 is independent of RNA.....	v
A.3.3. The BIV Rev bipartite NLS is essential and sufficient for interaction with B23.....	vi
A.3.4. Multiple domains within BIV Rev bipartite NLS interact with B23.....	vii

A.3.5. Interaction between BIV Rev and B23 is independent of nucleolar localization of Rev	vii
A.3.6. Knockdown of B23 in Cf2Th cells	xi
A.3.7. BIV Rev localizes mainly to the nucleolus of B23 knockdown cells.....	xi
A.3.8. Knockdown of B23 results in a reduction of BIV viral titers in Cf2Th cells	xiii
A.4. Conclusion	xiv
A.5. Material and methods.....	xiv
A.5.1. Cell cultures and transfections	xiv
A.5.2. Plasmids and plasmid constructs.....	xiv
A.5.3. Immunoprecipitation and immunoblotting	xiv
A.5.4. Immunofluorescence and microscopy	xv
A.5.5. Virus production	xv
A.5.6. siRNA treatment and virus infection	xvi
A.5.7. MTT assay.....	xvi
A.5.8. Viral RNA purification and real-time quantitative PCR analysis.....	xvi
A.5.9. Reverse transcriptase assay	xvii
A.6. Acknowledgments.....	xvii
Annexe B – Résultats complémentaires	xviii
B.1. Localisation de la protéine Rev du JDV avec l'étiquette HA.	xviii
B.2. Protéines purifiées observées par coloration au bleu de Coomassie.....	xix
B.3. Fractions obtenues suite à l'extraction et la purification des nucléoles.	xxi
B.4. Activité croisée entre les Revs et les RREs des différents lentivirus.....	xxii
B.5. Localisation du RRE du JDV	xxiii
Annexe C- Séquence de la protéine Rev du VIF (petaluma).....	xxiv
Annexe D – séquence Rev du JDV.....	xxv
Annexe E- Liste des amorces ayant servi à générer les diverses constructions plasmidiques utilisées dans l'article du chapitre 2.....	xxvi

Annexe F- Liste des amorces ayant servi à générer les diverses constructions plasmidiques utilisées dans l'article du chapitre 3.....	xxix
Annexe G - Structures tertiaires prédites dans la protéine Rev du JDV.....	xxxii
Annexe H- Structures tertiaires prédites dans la protéine Rev du VIF.....	xxxiii
Annexe I – Contributions de l'étudiante durant le Doctorat.....	i

Liste des tableaux

Table 2.1. Retroviral Rev and Rev-like NLS/NoLS sequences.....	71
Table 2.2. PKI, HIV-1 and JDV Rev NES sequences	75
Table 2.3. Hydrophobic residues for PKI NES optimal binding to CRM1	75
Tableau 5.1. Séquence NLS et NoLS dans les protéines Rev de Lentivirus	131
Tableau 5.2. Séquences NES connues et identifiées dans l'étude des protéines Rev	135

Liste des figures

Figure 1.1. Organisation structurale des rétrovirus.....	4
Figure 1.2. Organisation génomique provirale des virus appartenant au genre <i>Lentivirus</i>	6
Figure 1.3. Cycle de réplication des lentivirus.....	8
Figure 1.4. Évolution clinique et pathologique de la maladie de Jembrana.	16
Figure 1.5. Localisation des domaines fonctionnels connus ou prédits des différentes protéines Rev..	26
Figure 1.6. Localisation du RRE des différents Lentivirus.....	30
Figure 1.7. Modèle d'exportation de l'ARN viral par le complexe Rev-RRE-Crm1.....	37
Figure 2.1. Subcellular localization of the JDV Rev WT protein fused to EGFP.	53
Figure 2.2. Subcellular localization of the JDV Rev deletion mutant proteins fused to EGFP.....	56
Figure 2.3. The region encompassing amino acids (aa) 74 to 105 of the JDV Rev protein is associated with NLS/NoLS functions.....	59
Figure 2.4. The NLS of the JDV Rev protein is monopartite-like.....	62
Figure 2.5. Subcellular localization of EGFP fused to JDV Rev arginine residue cluster sequences.....	65
Figure 2.6. The JDV Rev protein contains a nuclear export signal (NES).....	67
Figure 2.7. The nuclear export activity of HIV-1 Rev containing JDV Rev WT or mutated NES sequences.....	69
Figure 2.S1. Subcellular localization of JDV Rev deletion mutant proteins fused to EGFP.....	77
Figure 2.S2. Nuclear export activity of JDV Rev with heterologous lentiviral Rev Response elements (RRE).....	78
Figure 2.S3. Subcellular localization of JDV Rev alanine substitution mutant proteins.....	79

Figure 2.S4. Nucleolar localization of the JDV Rev alanine substitution mutant proteins.....	80
Figure 3.1. Subcellular localization of the FIV Rev deletion mutant proteins.	93
Figure 3.2. The nuclear export activity of EGFP-FIV Rev WT or EGFP-FIV Rev deletion mutant proteins.....	94
Figure 3.3. The region encompassing aa 82 to 99 of the FIV Rev protein directs heterologous cytoplasmic proteins to the nucleus and nucleolus.	96
Figure 3.4. Site-directed mutagenesis of the putative FIV Rev NLS/NoLS.....	99
Figure 3.5. Functional analysis of FIV Rev proteins mutated in the NLS region.	99
Figure 3.6. Subcellular localization of the EGFP fused to various FIV NLS/NoLS mutant sequences.	102
Figure 4.1. L'importation nucléaire des protéines EGFP-Rev-His du JDV et du VIF dans les cellules HeLa est un mécanisme actif dépendant de facteurs cytosoliques.	115
Figure 4.2. Le traitement à l'importazole réduit l'importation de la EGFP fusionnées à différent NLS de la protéines Rev de différents lentivirus.	117
Figure 4.4. Interaction directe de Rev avec l'importine β 1.	121
Figure 4.5. Interaction directe de Rev avec différentes importines α	122
Figure 4.6. Interaction entre les protéines Rev de différents lentivirus fusionnées à la GST et les principales protéines du nucléole.....	127
Figure 4.7. Coimmunoprécipitation des protéines Rev du JDV et du VIF avec les principales protéines du nucléole.....	128
Figure 5.1. Domaines fonctionnels des protéines Rev des lentivirus.	139
Figure 5.2. Homologie de séquence entre les différentes importines.	143
Figure 5.3. Séquences NLS connues se liant à la transportine.	147
Figure A.1. BIV Rev forms specific interactions with nucleolar protein B23 in HEK293T cells.....	viii

Figure A.2. The region encompassing aa 71–101 of the BIV Rev protein that contains a nuclear localization signal (NLS) and nucleolar localization signal (NoLS) is sufficient for interaction with B23.	ix
Figure A.3. B23 siRNA knockdown and BIV Rev expression.....	x
Figure A.4. B23 is required for BIV replication.	xii
Figure B.1. Localisation cellulaire de la protéine Rev JDV-HA.	xviii
Figure B.2. Protéines recombinantes purifiées.	xix
Figure B.3. Protéines Rev de différents lentivirus en fusion avec la GST purifiées.	xx
Figure B.4. Extraction nucléolaire à partir de cellules BoMac et HEK 293T.	xxi
Figure B.5. Activité fonctionnelle de Rev avec différents RRE.	xxii
Figure B.6. Localisation du RRE du JDV.	xxiii

Liste des sigles

aa	acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARM	Arginine rich motif
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation
BSA	Bovine serum albumin
CAEV	Caprine arthritis-encephalitis virus
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein
CRM1	Chromosome region maintenance protein 1
CPN	Complexe du pore nucléaire
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DDX1	DEAD box helicase 1
EIAV	Equine infectious anemia virus
Env	Protéine de l'enveloppe virale
FIV	Feline immunodeficiency virus
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
GA	Glutaraldéhyde
Gag	Groupe antigène
HEK	Human embryonic kidney cells

HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
IBB	Importin β Binding
IN	Intégrase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JDV	Jembrana disease virus
kDa	Kilo Dalton
LTR	Longues répétitions terminales
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PKI	protéine kinase inhibitor
Pol	Polymérase
PR	Protéase
RBD	RNA binding domain
Rev	Régulateur de l'expression virale
RRE	Élément répondant à Rev (<i>Rev responsive element</i>)
RTN	Récepteur de transport nucléaire
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise

SIN	Signal d'inhibition de la diffusion nucléaire
siRNA	Small interference RNA, petit ARN d'interférence
SRLV	Small Ruminant Lentivirus, Lentivirus de petits ruminants
SU	Surface glycoprotein
TAR	Élément répondant à Tat
Tat	Transactivateur de la transcription
TI	Transcriptase inverse
TM	Transmembranaire
UNG	Uracil DNA glycolase
VAEC	Virus de l'arthrite encéphalite caprine
VAIE	Virus de l'anémie infectieuse équine
VIB	Virus de l'immunodéficience bovine
VIF	Virus de l'immunodéficience féline
Vif	Viral infectivity factor
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VMV	Virus Meadi-Visna
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U
WT	Wild-type

Liste des abréviations

α	Alpha
β	Bêta
$^{\circ}\text{C}$	Degrés Celsius
g	Gramme
x g	Gravité
h	Heure
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
M	Molaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
nt	Nucléotides
μg	Microgramme
μL	Microlitre
pb	Paire de base
%	Pourcentage
rpm	Révolution par minute
U	Unité

À mon père

Remerciements

J'aimerais remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, le Dr Guy Lemay ainsi que mon codirecteur, le Dr Denis Archambault pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans leur laboratoire et pour m'avoir encouragée à continuer à faire de la recherche.

Je remercie tous les gens de mon entourage qui ont cru en moi et qui m'ont encouragé dans mes études.

Finalement, merci au FRQNT qui m'a généreusement offert une bourse de Doctorat sans laquelle je n'aurais pu me consacrer à mes recherches comme je l'ai fait. Cette aide financière a été grandement appréciée.

Introduction

Les lentivirus se démarquent des autres rétrovirus en induisant des changements pathologiques chroniques et dégénératifs précédés d'une période d'incubation longue appelée période de latence. Le virus de la maladie de Jembrana (JDV) fait exception et produit une infection marquée par une phase clinique aiguë sans période de latence suivie de la récupération de l'animal. Les lentivirus se démarquent aussi par la complexité de leur génome qui possède plusieurs cadres de lecture ouverts ("Open Reading Frame") ou ORF. Ces derniers codent pour des protéines accessoires dont quelques-unes jouent un rôle important dans la régulation de la réplication virale. Les deux principales protéines de régulation sont Tat ("Trans-Activator of Transcription") et Rev ("Regulator of Virion Expression"). Alors que Tat agit à titre d'activateur transcriptionnel, Rev régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en assurant le transport des transcrits viraux. Cette dernière permet, en interagissant avec l'élément de réponse à Rev ("Rev Responsive Element" ou RRE), de faire passer les transcrits viraux d'ARN partiellement et non épissés du noyau vers le cytoplasme. (Oberste et al., 1993).

Présentement, les chercheurs possèdent peu de connaissances sur les différents domaines fonctionnels de la protéine Rev du JDV et du virus de l'immunodéficience féline (VIF). Ces domaines sont au nombre de trois. Le premier domaine est riche en résidus arginine et constitue le domaine de liaison à l'ARN ("RNA binding domain" ou RBD). Le second est le domaine de multimérisation et le dernier est un domaine riche en résidus leucine nécessaire pour l'exportation nucléaire de Rev via un signal d'exportation nucléaire ("Nuclear exportation signal" ou NES) (Daelemans et al., 2004). À l'intérieur du premier domaine se trouvent aussi les signaux de localisation nucléaire ("Nuclear Localisation Signal" ou NLS) et nucléolaire ("Nucleolar Localisation Signal" ou NoLS).

Si Rev ne peut accomplir sa fonction, les ARN viraux codant pour les protéines structurales ne peuvent être transportées au cytoplasme et ces dernières ne seront pas produites. Par conséquent, le virus ne pourra pas s'assembler et infecter les autres cellules.

Rev est donc indispensable à la réplication du VIH-1, ce qui en fait une excellente cible dans la recherche de nouvelles thérapies antivirales. Aussi, les études menées jusqu'à maintenant sur la caractérisation des domaines fonctionnels de Rev du virus de l'immunodéficience bovine (VIB) et du virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE) ont montré plusieurs caractéristiques qui les distinguent de la protéine Rev du VIH-1, ce qui laisse croire que de telles différences pourraient être observées pour les autres Rev non caractérisées (Gomez Corredor and Archambault, 2009; Gomez Corredor and Archambault, 2012). La caractérisation moléculaire et biologique de la protéine Rev est importante pour déterminer si le mécanisme d'action de Rev du JDV et du VIF est similaire à celui établi pour les protéines Rev des autres lentivirus. Les études approfondies de la protéine Rev pourront possiblement aboutir à une meilleure compréhension des différences qui existent entre deux virus qui appartiennent au même groupe de lentivirus, mais qui entraînent des maladies bien distinctes. Ainsi, les deux virus seront étudiés en parallèle pour certaines étapes du projet de recherche. Cette étude s'intéresse à la localisation des domaines fonctionnels dans la protéine et à leur composition en acides aminés ainsi qu'aux mécanismes de transport nucléo-cytoplasmique.

Ce document comporte quatre chapitres. Le premier chapitre présente une revue de la littérature concernant le JDV et le VIF, allant de leur découverte jusqu'à leur organisation génomique. La deuxième partie de ce chapitre traite plus en détail de la protéine Rev des lentivirus. Les résultats obtenus pour la caractérisation des principaux domaines fonctionnels de la protéine Rev du JDV et du VIF sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques (Chapitres II et III), et d'une section résultats supplémentaires pour le transport nucléo-cytoplasmique, la multimérisation et les partenaires d'interaction au nucléole (IV). Ensuite est présentée une discussion générale (Chapitre V). Une conclusion suit ces chapitres et comporte différentes avenues de recherches soulevées suite aux résultats de cette étude.

Chapitre I. État des connaissances

1.1. Les lentivirus

1.1.1. Classification et généralités biologiques

Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire à polarité positive présentant 2 copies identiques de cet ARN de 7 à 12 kb dans la capsid de la particule virale. Leur capsid est enveloppée et de forme généralement sphérique avec un diamètre moyen situé entre 100 et 200 nm (Figure 1.1) (Zhang et al., 2015). Comme tous les autres virus, ils doivent utiliser la machinerie cellulaire afin de se répliquer. Cependant, les rétrovirus sont caractérisés par la présence d'une transcriptase inverse (quelques autres virus possèdent cette enzyme dont l'Hépatite B de la famille des *Hepadnaviridae* (Summers and Mason, 1982)). La transcriptase inverse a pour rôle de copier l'ARN simple brin en ADN double brin pouvant alors s'insérer dans le génome de son hôte. Cette étape dans la réplication virale lui a valu son nom de « rétro » virus, car l'ADN est normalement transcrit en ARN pour la synthèse de protéine et non l'inverse. La transcriptase inverse étant peu fidèle et le brin d'ARN étant monocaténaire, les erreurs lors de la transcription inverse sont fréquentes. De ce fait, certains rétrovirus possèdent une grande variabilité génétique rendant difficile la prévention par la vaccination (Haase, 1986). Le virus intégré dans le génome de la cellule hôte (provirus) peut alors être répliqué en même temps que les autres gènes cellulaires. Selon leur tropisme, les virus vont infecter un ou plusieurs types de cellules et s'intégrer dans le génome de ces dernières. Ces derniers sont appelés rétrovirus exogènes. Dans ce cas, le virus pourra être éliminé en détruisant les cellules porteuses. Au contraire, d'autres virus vont occasionnellement s'intégrer dans une cellule germinale. Cette cellule pourrait alors venir à se développer en un organisme viable dans lequel le génome rétroviral fera partie intégrante de son propre génome. Ces derniers sont appelés rétrovirus endogènes. Il n'existe pas de mécanisme pour éliminer le virus dans ce cas puisque toutes les cellules seront porteuses. Cependant, certaines parties du virus

peuvent être éliminées par recombinaison, délétion, mutation ou présence d'un codon de terminaison qui interrompt le cadre de lecture ce qui prévient l'expression de protéines virales fonctionnelles et de virus infectieux. Ces virus sont dits défectifs et ne peuvent se répliquer (Telesnitsky, 2010).

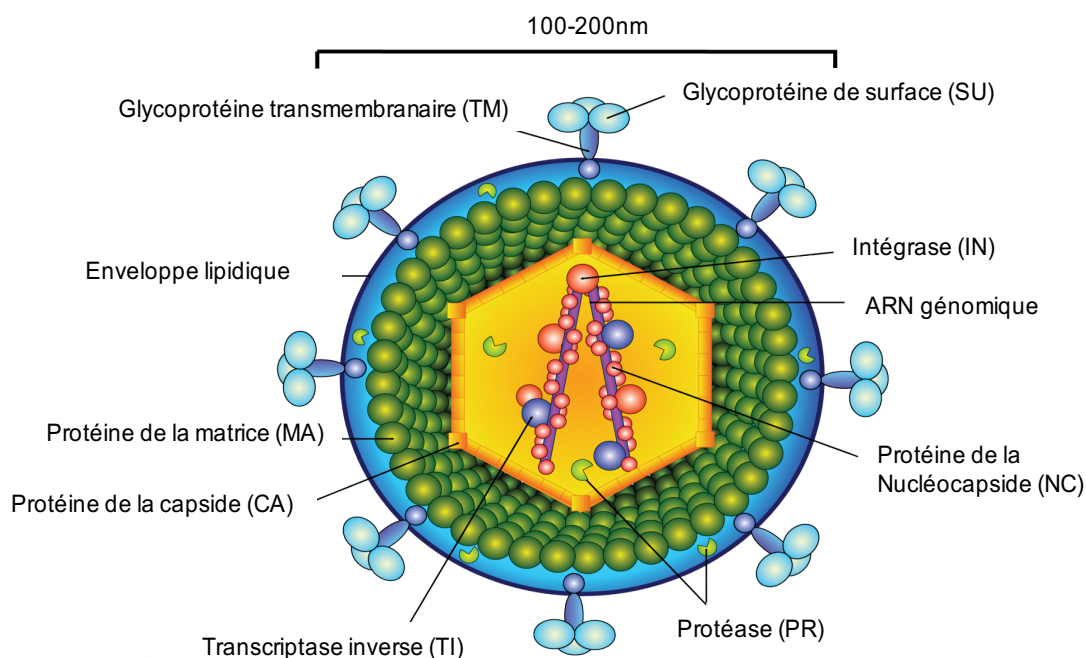


Figure 1.1. Organisation structurale des rétrovirus.

Les rétrovirus sont de façon générale composés d'une capsidique dans laquelle se trouvent 2 copies d'ARN monocaténaire à polarité positive. Ces ARN sont recouverts de protéines de la nucléocapsidique et associés à des enzymes dont l'intégrase, la transcriptase inverse et des protéases. La capsidique est elle-même recouverte par les protéines de la matrice puis d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines. Des protéines cellulaires peuvent parfois se retrouver dans l'enveloppe. L'image a été adaptée à partir de : <http://olivero.info/bari/r/retrovirus-structure/>.

La famille des rétrovirus (*Retroviridae*) est divisée en deux sous-familles, soit les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae*. La première regroupe six genres ; *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*. Le genre *Lentivirus* comprend le VIH, le virus de l'immunodéficience simienne

(VIS), le virus de l'immunodéficience féline (VIF), le virus Maedi-Visna (VMV) chez le mouton, le virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE), le virus de l'encéphalite et de l'arthrite caprine (VAEC), le virus de la maladie de Jembrana ou « Jembrana disease virus » (JDV) chez les bovins en Indonésie et le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) (St-Louis et al., 2004; Mahy, 2009).

Les lentivirus contrairement à d'autres rétrovirus ne sont pas oncogéniques. Ils sont plutôt reconnus pour induire des changements pathologiques chroniques et dégénératifs précédés d'une période d'incubation longue, excepté pour le JDV dont la maladie se déclare quelques jours suivant l'infection seulement (Haase, 1986; Soeharsono et al., 1990; Soesanto et al., 1990). Les changements pathologiques sont souvent associés au développement de lésions médiées par le système immunitaire. Tous les lentivirus infectent les macrophages et les monocytes, à l'exception encore une fois du JDV pour lequel aucune étude n'a pu montrer avec certitude l'infection de ces cellules. Le VIF, le VIS et le VIH infectent aussi les cellules T et certains infectent aussi les cellules B. Par conséquent, ils sont associés à des signes cliniques d'immunodéficience chez les hôtes infectés. De plus, les lentivirus, contrairement aux autres rétrovirus, peuvent se répliquer dans les cellules qui ne sont pas en division et peuvent donc infecter une plus grande variété de types cellulaires (Fassati, 2006). Cette caractéristique les rend d'autant plus intéressants pour la thérapie génique.

1.1.2. Organisation génomique

Tous les rétrovirus non défectueux possèdent au moins trois gènes. Le premier gène, *gag*, code pour un précurseur qui sera clivé pour former les protéines structurales internes du virion. Le gène *pol* code pour une transcriptase inverse et *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe. Plusieurs souches de rétrovirus peuvent aussi contenir des gènes additionnels qui auront été ajoutés au génome viral par recombinaison avec la cellule hôte.

Le génome des lentivirus est une structure complexe comprenant différents gènes accessoires dont certains codent pour des protéines impliquées dans la régulation de

l'expression des gènes viraux. Tous les lentivirus connus possèdent au moins trois gènes de plus que les gènes standards *gag*, *pol* et *env* (Figure 1.2). La présence des protéines codées par ces gènes donne lieu à des cycles de réplication comportant des voies de régulation très complexes ainsi que des mécanismes de persistance virale et d'évasion immunitaire (Tang et al., 1999; Evans and Desrosiers, 2001).

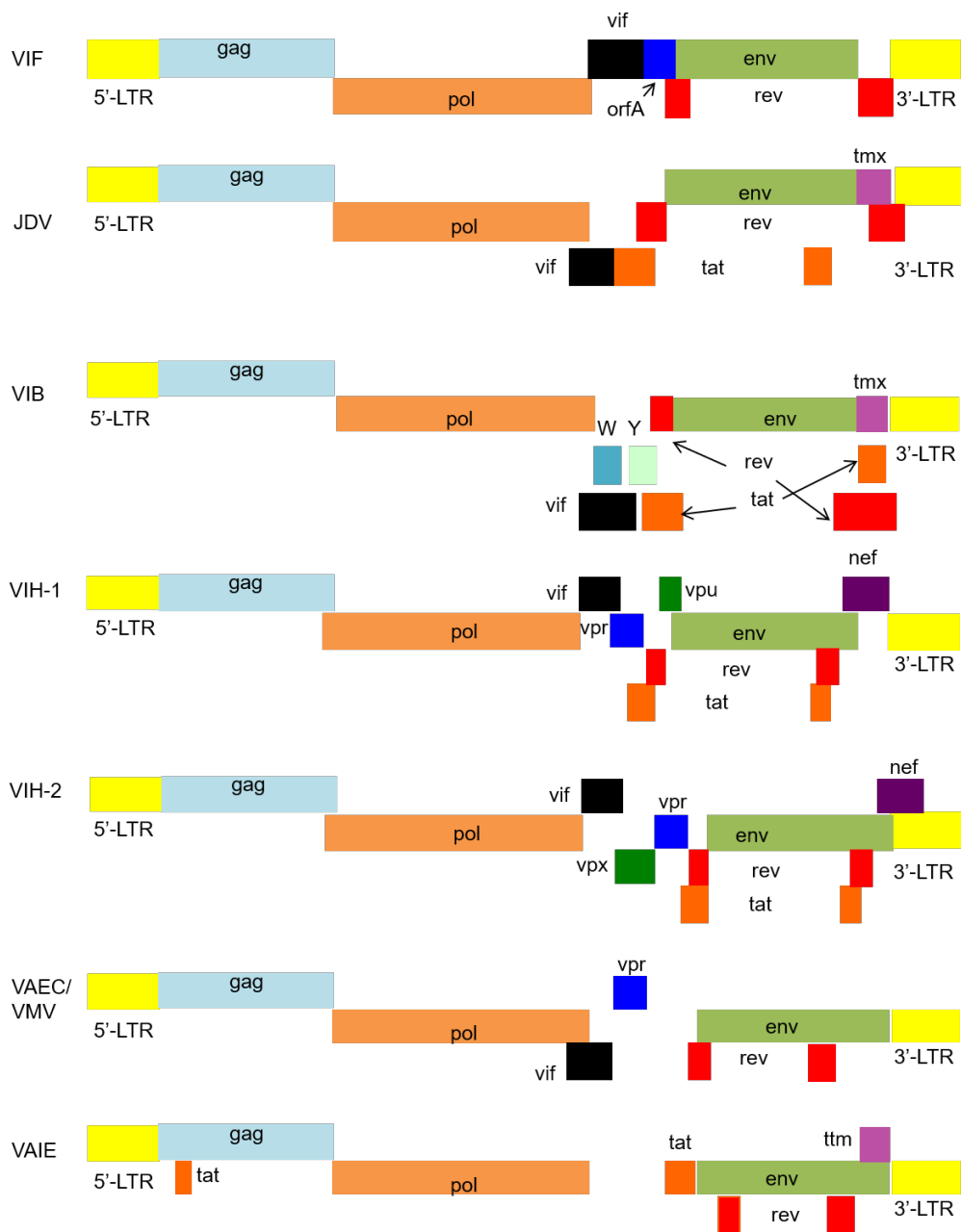


Figure 1.2. Organisation génomique provirale des virus appartenant au genre *Lentivirus*.

LTR, long terminal repeat; gag, acronyme pour group antigen est un gène codant une polyprotéine qui est clivée pour générer les protéines formant le noyau de la particule virale; pol, gène codant pour la polymérase virale (transcriptase inverse), une protéase et l'intégrase; env, gène codant pour les protéines de l'enveloppe; vif, viral infectivity factor; vpr, viral protein R; vpu, viral protein U; vpx, viral protein X; rev; regulator of expression of virion proteins; tat, Trans-Activator of Transcription; nef, Negative Regulatory Factor; tmx, ttm, orfA, W et Y codent pour des protéines du même nom.

1.1.3. Cycle de réplication

La réplication virale débute par la fixation du virus à son récepteur à la surface de la cellule par la glycoprotéine de surface du virion. Cette interaction entraîne alors un changement de conformation qui expose le domaine hydrophobe de la glycoprotéine transmembranaire. Cet événement mène à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire facilitant l'entrée du virus et le relâchement de la capsid virale dans le cytoplasme (St-Louis et al., 2004). La décapsidation libère l'ARN génomique dans le cytoplasme où il est copié par la TI en ADN double brin. Le provirus ainsi formé est ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée via l'intégrase virale. Dans le cas des lentivirus, suite à un stimulus donné, le virus peut sortir de sa latence et synthétiser de nouveaux ARN viraux. La protéine d'enveloppe (Env) ainsi que les précurseurs de Gag et Gag-Pol produits migrent à la membrane plasmique où l'ARN génomique est empaqueté durant le bourgeonnement des virions. La protéase virale clive ensuite les précurseurs Gag et Gag-Pol donnant la forme conique typique des lentivirus. Les virions peuvent alors infecter de nouvelles cellules (St-Louis et al., 2004) (Figure 1.3).

Les rétrovirus ont dû trouver un moyen pour exprimer plusieurs gènes à partir d'une seule unité provirale. Ils ont donc développé différents mécanismes pour contourner cet obstacle. Il existe trois différentes stratégies pour générer une série d'ARNm à partir d'un seul modèle soit, des sites alternatifs d'initiation de la transcription, l'épissage alternatif et des sites alternatifs de formation de l'extrémité 3'. Tous les rétrovirus utilisent leurs longues répétitions terminales ("Long Terminal Repeat" ou LTR) en 5' comme promoteur pour diriger la synthèse de l'ARN viral. Bien que la transcription rétrovirale soit dirigée par l'ARN polymérase II et une combinaison de facteurs spécifiques cellulaires et de promoteurs, certains virus codent

pour leur propre activateur de transcription. De plus, tous les rétrovirus utilisent l'épissage alternatif de leur transcrit pleine longueur afin de produire la diversité d'ARNm viraux requis. Le transcrit pleine longueur des rétrovirus a trois fonctions distinctes. La première est qu'il constitue le génome du virus. Il peut aussi servir de modèle pour la traduction des gènes Gag et Gag-Pol. Finalement, il sert d'ARN précurseur pour la production de divers ARNm sous-génomiques (Wodrich and Kräusslich, 2001; Shida, 2012).

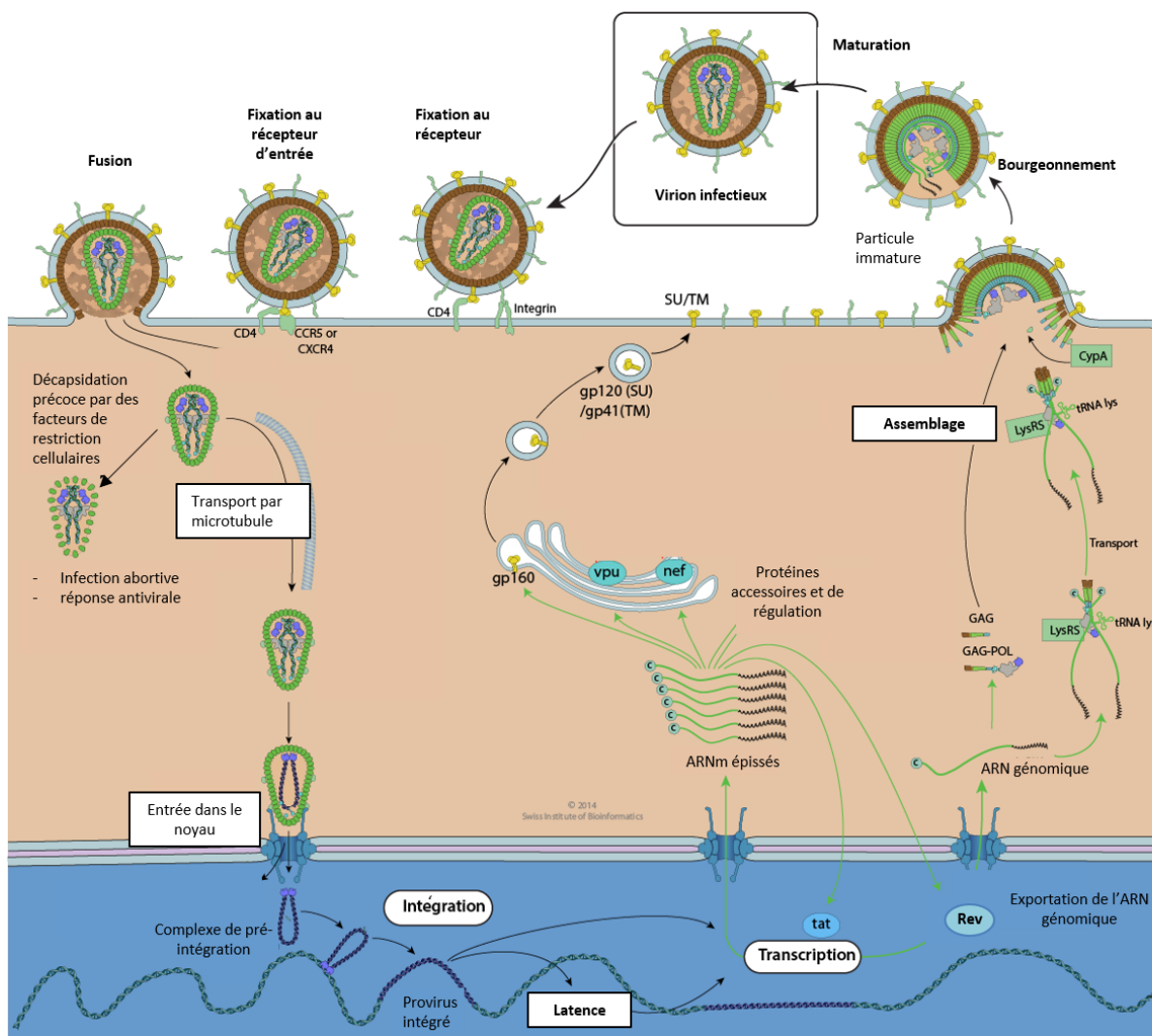


Figure 1.3. Cycle de réplication des lentivirus.

La réplication virale débute par la fixation du virus à son récepteur à la surface de la cellule par la glycoprotéine de surface du virion. Cette interaction entraîne alors un changement de conformation qui expose le domaine hydrophobe de la glycoprotéine transmembranaire. Cet événement mène à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire facilitant

l'entrée du virus et le relâchement de la capsid virale dans le cytoplasme. La décapsidation libère l'ARN génomique dans le cytoplasme où il est copié par la TI en ADN double brin. Le provirus ainsi formé est ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée via l'intégrase virale. Suite à un stimulus donné, le virus peut sortir de sa latence et synthétiser de nouveaux ARN viraux. Dans la phase précoce, les ARNm sont épissés et vont mener à l'expression de Rev et de Tat. Ces protéines vont migrer au noyau pour débiter la phase tardive. Dans cette phase, Rev va permettre la sortie des ARNm viraux à l'extérieur du noyau avant qu'ils ne soient épissés afin de produire les protéines de structure. La protéine d'enveloppe (Env) ainsi que les précurseurs de Gag et Gag-Pol produits migrent à la membrane plasmique où l'ARN génomique est empaqueté durant le bourgeonnement des virions. La protéase virale clive ensuite les précurseurs Gag et Gag-Pol donnant la forme conique typique des lentivirus. Les virions peuvent alors infecter de nouvelles cellules. Image adaptée de <https://viralzone.expasy.org/5096>

Normalement, les pré-ARN messagers contenant des introns sont retenus au noyau par leur interaction avec des facteurs d'épissage jusqu'à ce qu'ils soient complètement épissés ou dégradés. Les ARN partiellement et non épissés des rétrovirus doivent faire face à cette problématique. Ces ARN contiennent au moins un intron, mais doivent entrer dans le cytoplasme pour servir de modèle pour la synthèse de certaines protéines telles que Env, Gag et Gag-Pol. Deux mécanismes post-transcriptionnels sont utilisés par les rétrovirus pour éviter la séquestration nucléaire de leur ARNm contenant un ou des introns et leur exportation dans le cytoplasme. Le premier mécanisme dépend de la protéine virale Rev (ou Rev-like) et est utilisé par tous les lentivirus ainsi que le virus T lymphotrope humain ("Human T-Lymphotropic virus" ou HTLV-I et II). Pour ce virus, la protéine se nomme Rex. Cette protéine interagit directement avec une cible agissant en cis, l'élément de réponse à Rev (RRE ou RxRE pour HTLV) qui est présent sur tous les ARNm qui ne sont pas complètement épissés. Le complexe induit leur exportation nucléaire. Le second mécanisme est utilisé par les autres rétrovirus. Il comprend une séquence ARN agissant en cis qui fonctionne indépendamment des protéines virales. Comme ces séquences interagissent directement avec les facteurs d'exportation des ARN cellulaires, ils ont été nommés éléments de transport constitutifs ("constitutive transport elements" ou CTEs). Plusieurs protéines cellulaires et virales portent un motif hydrophobe similaire au NES de Rev et de Rex. Ces éléments sont importants pour l'exportation nucléaire (Pollard and Malim, 1998; Wodrich and Kräusslich, 2001; Blissenbach et al., 2010).

La régulation de la réplication virale dépend de facteurs agissant en *trans* qui interagissent avec le LTR. Ces éléments ressemblent aux promoteurs eucaryotiques puisqu'ils régulent l'expression des gènes et contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription (Krebs et al., 2001). Les LTR contiennent trois régions, soit U3, R et U5. La région U3 contient des signaux d'initiation, d'amplification et de terminaison pour la transcription. La région R est présente sur tous les transcrits viraux et contient TAR (« Trans-Activation Responsive element »), une structure à laquelle se lie la protéine Tat pour augmenter la transcription. Fait intéressant, la région U3 contient une seule copie de plusieurs séquences putatives servant de site de liaison pour des facteurs de transcription. Une fois le provirus intégré, le LTR en 5' sert de promoteur pour le génome viral entier tandis que le LTR en 3' voit à la terminaison et à la polyadénylation des ARN viraux (Krebs et al., 2001).

Tous les rétrovirus possèdent une protéase, une transcriptase inverse et une intégrase. Une quatrième enzyme beaucoup moins étudiée et retrouvée chez plusieurs rétrovirus est la dUTPase (deoxyuridine 5'-triphosphate nucléotide-hydrolase). Cette enzyme a pour rôle de catalyser l'hydrolyse des dUTP afin de limiter les événements d'incorporation d'uraciles dans l'ADN qui devra alors être réparé (Vértessy and Tóth, 2009). Cette enzyme est donc aussi retrouvée chez la plupart des organismes vivants et plusieurs virus à ADN. Le VIF, le VAEC le VMV et le VAIE possèdent tous une dUTPase fonctionnelle. Le génome des lentivirus bovins se démarque des autres lentivirus non primate par l'absence d'une dUTPase fonctionnelle. Le VIB et le JDV possèdent dans leur génome un gène homologue à celui de la dUTPase retrouvé chez les autres lentivirus non-primates. Cependant, aucune activité catalytique n'a pu être observée pour cette protéine de seulement 74 acides aminés (130 acides aminés et plus pour les autres dUTPases caractérisées). Par contre, il est clair que cette protéine joue un rôle important pour la réplication de ces virus puisque sa séquence est très bien conservée entre les différentes souches du VIB et du JDV et que des mutations dans ce gène bloquent la production de virions dans les cellules infectées par le VIB (Voronin et al., 2014). Parmi les rétrovirus qui ne codent pas pour une telle enzyme, on retrouve les lentivirus primates. Ces derniers recrutent plutôt une enzyme qui joue un rôle équivalent présente dans la cellule hôte appelée UNG (uracil DNA glycolase) qui permet de retirer les uraciles de l'ADN

(Schröfelbauer et al., 2005).

1.1.4. Les protéines accessoires et de régulation

Les lentivirus de primates sont les plus complexes au niveau génomique, car ils possèdent six gènes codant pour des protéines accessoires ou de régulation dont *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu/vpx* et *nef* dont les trois derniers leur sont exclusifs. Le génome du VIB est le plus complexe des lentivirus non primates contenant six ORF codant pour les protéines Tat, Rev et Vif, mais aussi Vpw, Vpy et Tmx. Le génome du VAIE code pour quatre de ces protéines, soit Rev, Tat, Ttm et S2 (Fagerness et al., 2006). Il est le seul à ne pas posséder la protéine Vif. Le génome des lentivirus de petits ruminants, le VAEC et le VMV, code pour les protéines Rev, Vif et Vpr-like. De son côté, le génome du VIF code pour Rev, Vif et OrfA. Fait intéressant, les trois derniers virus mentionnés ne possèdent pas de gène codant pour Tat. Pourtant, les deux principales protéines qui ont un rôle clé dans la régulation de la réplication virale dès la phase précoce sont Tat et Rev. Alors que Tat agit à titre d'activateur transcriptionnel, Rev régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en assurant le transport des transcrits d'ARN. La protéine Rev qui fait l'objet de notre étude sera traitée plus loin.

Tous les lentivirus possèdent une protéine Tat qui peut être classée selon deux groupes fonctionnels. Dans le premier groupe qui comprend le VIB, JDV, le VIH-1 et 2, le VIS et le VAIE, Tat exerce son rôle en augmentant le taux d'élongation plutôt que d'initier la transcription en utilisant l'ARN polymérase II cellulaire. Dans le deuxième groupe qui comprend le VMV, le VAEC et le VIF, une pseudo-Tat (OrfA pour le VIF et Vpr-like pour les deux autres) agit via des sites de liaison des facteurs de transcription situés dans la région U3 des LTR (St-Louis et al., 2004). La protéine Tat exerce aussi deux autres rôles très différents. Elle peut induire l'apoptose et l'inhibition de la formation des petits ARN d'interférence (siRNA) par la protéine Dicer (Li et al. 2005). Il a aussi été montré que la Tat du VIH-1 peut moduler l'expression de certains gènes cellulaires tels que le CMH-1, TNF- α , IL-2, IL-6 et des protéines de la matrice extracellulaire (Chen et al., 2000). Lors d'une infection par le VIH-1, la protéine Tat est présente dans le sérum des patients infectés et est

impliquée dans la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte (Ensoli et al., 1993). En effet, la protéine Tat est capable de recruter la voie du récepteur de type Toll-like (TLR4), suite à une interaction de haute affinité avec le complexe TLR4-MD2. Cette interaction entraîne la production de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et de cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) (Ben Haij et al., 2013). Cette signalisation entraîne à son tour une régulation à la hausse de la protéine PD-L1 à la surface de la cellule cible, ici principalement des cellules dendritiques, qui ne peut alors stimuler efficacement la prolifération de cellules T spécifiques de l'antigène et réduit en même temps l'apoptose des cellules T régulatrices (Planès et al., 2014). De plus, Tat est requise pour une transcription inverse efficace du VIH-1 (Harrich et al., 1997). La protéine Tat du VIH-1 semble donc être pléiotropique relativement à ses fonctions.

La protéine Nef des lentivirus primates affecte l'expression de plusieurs protéines cellulaires à la surface de la cellule infectée dont CD4, CD8, CD28, MHC-1 et 2. Elle interfère aussi avec différentes voies de transduction du signal dans la cellule infectée et facilite le mouvement du nucléoïde (« core » en anglais) à travers les microtubules qui forment une barrière potentiellement obstructive en réorganisant l'actine au niveau du cortex cellulaire lors de la sortie du virus. Finalement, Nef peut lier le cholestérol par un motif de reconnaissance à son extrémité C-terminale et le transporter au site de bourgeonnement où il est essentiel. Elle facilite donc la sortie du virus (Li et al., 2005). La protéine S2 du VAIE joue un rôle similaire à Nef (Chande et al., 2016).

Les cellules hôtes humaines expriment le facteur de restriction APOBEC3. Ce dernier est une cytosine déaminase. Ces protéines sont empaquetées dans le virion où elles insèrent des mutations G \rightarrow A dans l'ADNc viral nouvellement synthétisé ce qui entraîne la terminaison de la réplication virale. Pour pallier à ce problème, les lentivirus codent pour une protéine appelée Vif pour « viral infectivity factor ». Cette dernière recrute une E3 ubiquitine ligase et des cofacteurs pour former un complexe qui va dégrader les protéines APOBEC3 via le protéasome (Mariani et al., 2003).

La protéine Vpr du VIH-1 permet d'accélérer la réplication virale et les effets cytopathiques sur les cellules T et permet une réplication dans les macrophages (St-Louis et al., 2004). La protéine Vpu du VIH-1 est une viroporine produite dans la phase tardive de réplication. Ses principales fonctions sont la régulation à la baisse de l'expression des récepteurs CD4 à la surface cellulaire et de favoriser la sortie des virions des cellules infectées (St-Louis et al., 2004). Les gènes codant pour les protéines Vpw et Vpy du VIB sont situés dans le cadre de lecture ouvert du gène *vif*. Leur rôle demeure indéterminé, mais selon leur localisation génomique, ils pourraient avoir un rôle similaire aux protéines Vpr et Vpu du VIH-1.

1.2. Le virus de la maladie de Jembrana

Le virus de la maladie de Jembrana ou « JDV pour *Jembrana disease virus* » est un lentivirus associé à un syndrome de maladie aiguë avec un taux de mortalité d'environ 20% chez l'espèce *Bos javanicus* en Indonésie. La maladie apparaît après une courte période d'incubation sans récurrence de la maladie après rétablissement (Soesanto et al., 1990). L'absence de récurrence de la maladie chez les bovins rétablis d'une infection par JDV ainsi que l'habileté du virus à induire une réponse immunitaire protectrice contre la même souche et des souches hétérologues suggèrent qu'il s'agit d'un lentivirus atypique dans lequel on observe peu de variation génétique. Il a d'ailleurs été montré que le JDV est remarquablement stable génétiquement et n'a subi que quelques variations mineures sur une période de 20 ans à Bali et ce malgré le fait qu'il soit devenu endémique sur l'île (Desport et al., 2009). À ce jour, très peu d'études sur la biologie moléculaire de ce virus ont été réalisées probablement à cause du confinement du virus à une région restreinte et à l'absence de modèle *in vitro* pour sa réplication.

1.2.1. Hôtes

Bien que la présence du VIB ait été reportée globalement, le JDV n'a été observé que chez les bovins de Bali en Indonésie (Horzinek et al., 1991; Meas et al., 1998; Burkala et al., 1999; Barboni et al., 2001). Cependant, d'autres types de bovins sont aussi susceptibles au virus. L'infection de bovins Friesian (*Bos taurus*) et des bovins hybrides de Bali (*Bos javanicus x Bos indicus*) a induit des changements cliniques et des lésions cohérentes avec ceux détectés dans les bovins de Bali. Par contre, ces symptômes étaient moins importants et donc difficiles à détecter sur le terrain. Les bovins hybrides inoculés ont montré une virémie élevée pour 3 mois et ont développé une réponse en anticorps contre le virus qui a persisté durant au moins 46 semaines suivant l'infection (Soeharsono et al., 1995).

Les bovins infectés avec le JDV se sont avérés résistants à une réinfection avec une souche hétérologue du virus sans aucune évidence de récurrence de la maladie après guérison (Soeharsono et al., 1990; Soeharsono et al., 1995). Cependant, une infection par le VIB n'a pas prévenu une infection subséquente par le JDV ni amélioré les signes cliniques de la maladie de Jembrana chez les bovins infectés. Toutefois, la dynamique de l'infection par le JDV a été modifiée. Le début et la fin du processus de la maladie aiguë ont été devancés (McNab et al., 2010).

1.2.2. Transmission

Même si la transmission verticale du virus par les fluides corporels n'a pas été totalement étudiée, il existe des évidences montrant que le virus est répandu dans le lait des bovins durant la phase aiguë. De plus, des infections intranasales, orales et conjonctivales ont pu être reproduites expérimentalement (Soeharsono et al., 1995). Une autre voie hypothétique de transmission repose sur des arthropodes hématophages durant la phase aiguë de la maladie lorsque les titres viraux dans le sang sont élevés comme observé pour le VAIE (Issel and Foil, 1984; Soeharsono et al., 1995).

1.2.3. Tropisme

Les autres lentivirus non primate montrent un tropisme pour les cellules de la lignée des monocytes/macrophages. Le VIB et le VIF ont un tropisme beaucoup plus large incluant plusieurs autres types de cellules alors que le VAIE a un tropisme dominant pour les macrophages. Bien que la pathogenèse du JDV possède plusieurs similarités avec le VAIE, les macrophages n'ont pu être identifiés comme une population cible de manière concluante (Desport et al., 2009). Comme tous les autres lentivirus infectent les macrophages, le JDV représenterait un virus exceptionnel dans le sens où il ne peut pas infecter les macrophages. L'infection expérimentale de bovins provenant de Bali a permis d'identifier les cellules matures contenant des IgG (cellules B) comme étant la principale cible du virus. Ce tropisme pourrait avoir un lien avec la pathogenèse, la réponse différée en anticorps et la composition génétique du JDV (Desport et al., 2009). Malgré les efforts des chercheurs, il n'existe actuellement aucun système de culture pour ce virus pour les études *in vitro*.

1.2.4. Pathologie et symptômes cliniques

La maladie causée par le JDV est différente des autres infections lentivirales. Elle entraîne une maladie clinique aiguë pouvant durer jusqu'à douze jours suivant une courte période d'incubation de même durée (Soeharsono et al., 1990). Les signes cliniques observés incluent de la fièvre, de la léthargie et une lymphadénopathie. Des changements hématologiques ont aussi lieu durant la phase aiguë et comprennent des concentrations élevées d'urée dans le sang, une diminution des protéines plasmatiques, une leucopénie découlant d'une lymphopénie, une éosinopénie ainsi qu'une thrombocytopénie (Figure 1.4) (Soesanto et al., 1990).

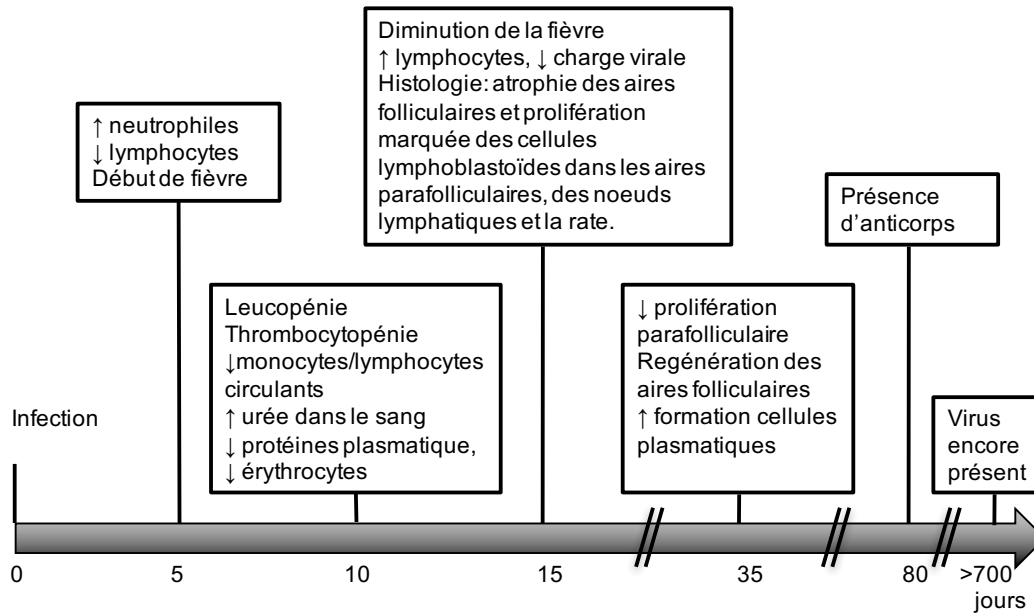


Figure 1.4. Évolution clinique et pathologique de la maladie de Jembrana.

Au niveau histologique, une atrophie des aires folliculaires (cellules B) et une prolifération des cellules lymphoblastoïdes dans les aires parafolliculaires (cellules T) des nœuds lymphatiques et de la rate sont observées (Dharma et al., 1991). Après cinq semaines, l'effet contraire se produit, soit une diminution de la prolifération parafolliculaire, la régénération des cellules folliculaires et une augmentation dans la formation de cellules du plasma (Dharma et al., 1991). Les anticorps contre JDV ne sont détectés qu'après la rémission et ne sont observés qu'après onze semaines suivant l'infection chez la majorité des individus (Hartaningsih et al., 2001). Wareing et al. (1999) ont montré l'effet d'une infection par le JDV sur la réponse en anticorps à l'ovalbumine (OVA) de poulet et la souche 19 de la bactérie *Brucella abortus* chez un bovin de Bali. Chez les individus infectés, la réponse IgG et IgM à OVA était absente et retardée respectivement alors que la réponse IgG à la bactérie était retardée par rapport aux individus sains. Ces résultats indiquent une réponse immunitaire humorale déficiente lorsque les bovins sont infectés par le JDV. L'analyse en cytométrie de flux des cellules mononucléées du sang périphérique ou « PBMC pour *peripheral blood mononuclear cell* » durant la phase aiguë de la maladie présente un nombre réduit de lymphocytes. Cette diminution est le résultat d'une baisse de la proportion et du nombre de

cellules T CD4. Le nombre de cellules T CD8 et de cellules B CD21 reste inchangé. À la fin de la phase aiguë, ces deux derniers groupes de cellules augmentent de façon significative alors que les cellules T CD4 restent à un niveau inférieur à la normale. Il est donc possible de spéculer que la déplétion persistante des cellules T CD4 ne permettrait pas une activation adéquate des cellules B menant à une baisse significative voire une absence de production d'anticorps dirigés contre JDV plusieurs semaines suivant la rémission malgré une augmentation des cellules B (Tenaya et al., 2012). La réponse en anticorps est donc retardée et atteint son maximum entre 23 et 33 semaines suivant l'infection. Cependant, la réponse est persistante et des anticorps spécifiques au JDV sont détectés même après 59 semaines suivant l'infection (Hartaningsih et al., 1994). Chez les individus de Bali qui surmontent la maladie, le virus reste toutefois présent et a été observé même plus de 25 mois suivant la rémission de la maladie clinique (Soeharsono et al., 1990).

Les changements histologiques observés et la réponse en anticorps différée suggèrent que l'infection par le JDV entraîne une détérioration de la fonction immunitaire humorale et que le mécanisme de rémission dépend probablement des cellules T. Quant au taux de mortalité élevé, il est souvent associé à la présence d'infections secondaires suite à une immunosuppression survenant durant le syndrome de la maladie aiguë (Dharma et al., 1991).

1.2.5. Biologie moléculaire

La souche Tabanan/87 du JDV a été entièrement séquencée (Chadwick et al., 1995) et s'est avérée être génétiquement et antigéniquement similaire à un autre lentivirus bovin, le VIB (VanDerMaaten et al., 1972; Garvey et al., 1990; Kertayadna et al., 1993). Le génome du JDV est composé de 7732 nucléotides, ce qui représente 750 nucléotides de moins que celui du VIB (Garvey et al., 1990; Chadwick et al., 1995). Il est par conséquent le lentivirus avec le plus petit génome. L'organisation génomique du JDV est similaire aux autres lentivirus et particulièrement à l'organisation du VIB. On y retrouve les principaux gènes rétroviraux obligatoires dont *gag*, *pol* et *env* ainsi que plusieurs gènes accessoires et de régulation tels que *tat*, *rev*, *vif* et *tmx* (Figure 1.2) (Chadwick et al., 1995).

Au niveau des principaux gènes, seulement deux sites de clivage sont conservés au niveau du précurseur de gag chez le JDV (5 chez le VIB) donnant les protéines de la matrice, de la capsidie et de la nucléocapsidie (Chadwick et al., 1998). Le gène *pol* code pour une polyprotéine de 1027 acides aminés et de 118 kDa qui est ensuite clivée par des protéases cellulaires pour former l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéase virale. La polyprotéine produite suite à la transcription et la traduction du gène *env* est composée de 781 acides aminés et a une taille de 89 kDa. Elle est clivée par la protéase virale pour former les glycoprotéines transmembranaires (TM) et de surface (SU) avec un poids moléculaire respectif de 41 et 47 kDa (Desport and Lewis, 2010). Les régions SU et TM du gène *env* du JDV sont très différentes de celles du VIB ne présentant que 24 et 39% d'identité respectivement. Ces régions, en particulier celle de la TM, sont connues pour affecter le tropisme viral et les effets cytopathiques observés. Cette région affecte aussi l'habileté du virus à induire la prolifération des lymphocytes quiescents. À titre d'exemple, une étude dans laquelle la partie cytoplasmique de TM a été tronquée a notamment montré une variation de tropisme chez le SIV. La protéine produite étant plus petite était plus abondante dans les virions et cette augmentation de densité s'est avérée importante au niveau du tropisme cellulaire (Johnston et al., 1993). Les différents types cellulaires montrent des différences dans les protéines et les lipides qui composent leur membrane cellulaire. Pour entrer et parfois même sortir de la cellule, les virus interagissent avec ces molécules. Par conséquent, il est possible que la différence de composition des membranes cellulaires puisse refléter la différence de susceptibilité des différentes cellules.

Le LTR du JDV a une taille de 397 nucléotides et contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-4 et SP-1. Il contient aussi une boîte TATA très bien conservée. Bien que les deux virus présentent une forte homologie de séquence, le LTR du JDV montre une délétion majeure de 157 pb par rapport au LTR du VIB. Cette délétion mène à l'absence de certains éléments amplificateurs dont le motif CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) qui est présent chez la plupart des promoteurs eucaryotes et rétroviraux (Chadwick et al., 1995). Chez le VIH-1, une mutation dans ce motif empêche la réplication du virus dans les macrophages primaires (Henderson et al., 1996).

L'absence de cet élément dans le LTR du JDV pourrait en partie expliquer l'absence de réplication du virus dans ce type cellulaire alors que tous les autres lentivirus peuvent s'y répliquer.

Deux transcrits d'ARNm du gène *env* ont été identifiés et diffèrent par la présence d'un petit exon non codant. Cet exon a aussi été observé dans les transcrits de *rev* et *tat*. Chez le VIH-1, de tels exons ont été associés avec des variations dans l'expression des gènes. (Krummheuer et al., 2001). Puisque ces petits exons non codants n'ont pas été observés pour le VIB, il est possible de penser qu'ils pourraient jouer un rôle dans les titres viraux élevés et la pathogénicité du JDV lorsque comparé au VIB (Desport and Lewis, 2010).

1.2.6. Les protéines accessoires et de régulation

Le génome du JDV code pour un certain nombre de protéines accessoires et de régulation. Bien qu'il présente un certain degré d'homologie avec le VIB, il ne possède pas de gènes codant les protéines Vpw et Vpy. Outre les protéines Rev et Tat, le génome du JDV code aussi pour les protéines Vif et Tmx. La protéine Rev sera traitée en détail plus loin.

La protéine Tat du JDV est exprimée à partir d'un transcrit épissé contenant deux exons dérivés de cadres de lecture différents provenant de la région centrale et 3' du génome (Chadwick et al., 1995). Dans le premier exon se trouve une région riche en cystéine, un domaine basique et une région centrale. Ces éléments sont retrouvés dans les protéines Tat de la majorité des Lentivirus. Tat migre au noyau pour réguler à la hausse l'expression des gènes du JDV. Elle agit en se liant à une structure en épingle à cheveux, l'élément de réponse de trans-activation TAR, présent dans la région R des ARN viraux naissants et en recrutant certains facteurs de la cellule hôte dont la cycline T et Cdk9 (Goff, 2001). Tat recrute ensuite une série de complexes transcriptionnels incluant des enzymes avec une activité histone ou facteur acétyl transférase (HAT ou FAT) qui modifient la chromatine au site d'intégration de l'ADN proviral et le rend par le fait même propice à la transcription (Li et al., 2005). Elle peut aussi recruter P-TEFb, un complexe kinase pouvant phosphoryler le domaine C-terminal de la polymérase II pour ajuster son activité. Le JDV code pour la protéine Tat la plus puissante de

tous les Lentivirus. Elle peut transactiver tous les LTR et se substituer à la Tat du VIH-1 dans le génome viral (Chen et al., 2000). Elle est aussi très probablement impliquée dans la pathogenèse aiguë observée dans la maladie de Jembrana. Tout comme pour le VIH-1, la protéine Tat est sécrétée à l'extérieur de la cellule. La protéine est ensuite internalisée par les cellules voisines où elle peut transactiver les LTR du JDV et moduler l'expression des gènes cellulaires. Cela aurait pour but de rendre les cellules plus susceptibles à l'infection par le JDV (Deng et al., 2006). Plusieurs variantes d'épissage de *tat* sont retrouvées durant la phase aiguë de la maladie de Jembrana et la protéine est détectée tôt dans l'infection avant l'apparition des symptômes dans des extraits d'ARN provenant de PBMC et de la rate (Setiyaningsih et al., 2008). *In vitro*, Tat peut induire l'apoptose possiblement via une interaction entre sa région riche en cystéines et le cytosquelette de la cellule. Tat possède aussi une région riche en arginine (basique) formant un motif de translocation responsable de l'internalisation de la protéine Tat extracellulaire (Desport and Lewis, 2010). La protéine Tat du JDV est un transactivateur potentiel des autres promoteurs de lentivirus animaux et primates. Elle peut activer en trans les LTRs du VIB et du VIH-1 à des niveaux similaires à ceux obtenus avec leur protéine Tat respective. Par contre, la protéine Tat du VIH-1 n'a qu'un effet minimal sur l'expression des LTRs du JDV alors que la protéine Tat du VIB a un effet modéré. Ces résultats suggèrent que JDV utilise un mécanisme de transactivation similaire bien que non identique à celui des autres lentivirus animaux et primates (Chen et al., 2000).

La protéine Vif agit tardivement dans le cycle de réplication et est requise pour une production optimale des virions. Un rôle dans l'assemblage des virions a été suggéré. Chez le VIH-1, Vif est empaquetée dans les particules virales où elle est clivée par les protéases. Elle stabilise le complexe de nucléoprotéines par une interaction avec la région 5' des ARN viraux. De plus, elle module la TI via son domaine C-terminal en stimulant à la fois la liaison de la TI et de l'amorce ou en augmentant le taux de polymérisation de la TI (Li et al., 2005). Les protéines APOBEC3 sont des cytosines déaminases cellulaires. Elles agissent en tant que facteurs de restriction qui inhibent la réplication du VIH-1. Ce facteur de restriction est aussi présent chez les bovins. La protéine Vif du JDV possède donc une fonction similaire à celle du VIH-1 (Yamada et al., 2016).

Le génome du JDV porte un dernier gène nommé *tmx* localisé presque au même endroit que le gène *nef* du VIH-1 sur leur génome respectif. La protéine Tmx a un poids moléculaire de 19 kDa et est détectée dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les virions (Gonda et al., 1994). Elle est produite dans la phase précoce avec Rev et Tat. Cependant, son rôle est toujours inconnu. De par sa localisation, il est suggéré que la protéine Tmx aurait un rôle similaire à la protéine Nef du VIH-1 bien que ces protéines ne soient pas reliées génétiquement (Desport and Lewis, 2010). Elle jouerait donc un rôle dans la sortie du virus. D'ailleurs, les protéines Tmx (JDV/VIB) et Ttm (VAIE) sont dérivées du gène de la partie C-terminale de la TM, protéine importante pour le tropisme viral.

1.3. Le virus de l'immunodéficience féline

Le virus de l'immunodéficience féline ou VIF a été décrit pour la première fois en 1987 en tant qu'agent causant un syndrome d'immunodéficience fatal chez les chats d'une chatterie de la ville de Petaluma en Californie (Pedersen et al., 1987; Yamamoto et al., 1988). Tout comme le virus d'immunodéficience simienne, c'est un virus largement répandu dans la nature. La grande variation génétique entre les différentes souches du VIF intra et inter espèces indique que le virus est présent chez les félidés depuis très longtemps. La prévalence du virus chez les chats en santé peut être de moins de 1% dans les pays de l'Europe centrale et les États-Unis alors qu'elle peut atteindre 30% au Japon et en Australie (Beebe et al., 1994).

Chez le chat domestique, la période d'incubation avant que le virus n'induisse une phase terminale s'apparentant au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est d'environ 7 à 9 ans. Ce laps de temps est un intermédiaire entre l'infection simienne (2 ans) et humaine (10 ans). Les premiers stades de l'infection par le VIF s'apparentent de près aux stades correspondants d'une infection par le VIH (Yamamoto et al., 1988).

Le VIF ressemble de près au VIH-1 et au VIS en ce qui concerne son tropisme, sa composition protéique et sa morphologie (Pedersen et al., 1989). Les manifestations

pathologiques de la maladie comprennent des infections de la cavité orale, des voies respiratoires supérieures, de l'intestin, des conjonctives et du système nerveux (Bendinelli et al., 1995). Des études histologiques ont permis d'observer la présence de cellules infectées par le virus dans la moëlle, les nœuds lymphatiques, le thymus, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, la rate. Seulement quelques cellules infectées ont été observées dans le foie et aucune dans les reins ou le cerveau (Rogers et al., 2002). Bien que les chats subissent une séroconversion suite à l'infection par le VIF, ils ne succombent pas à la maladie d'immunodéficience avant plusieurs années d'incubation.

Les études montrent que les cibles du VIF *in vitro* et *in vivo* incluent les cellules T CD4, les macrophages, les cellules dendritiques, les microglies et les astrocytes tout comme pour le VIH. Les cibles du VIF incluent aussi les cellules T CD8 et les cellules B (Brown et al., 1991; Dean et al. 1999; Rogers et al., 2002). Contrairement au VIH, le VIF utilise le récepteur de chimiokines (CXCR4) et non le récepteur CD4 des cellules T. Toutefois, la même déplétion sélective des cellules T CD4 est observée comme pour le VIH et le SIV (Nakagaki et al., 2001). L'utilisation de CD134 comme récepteur par les souches primaires du VIF peut expliquer l'interaction avec les cellules T CD4 et leur déplétion observée lors d'une infection par le VIF ainsi que les similarités dans l'immunodéficience acquise induite par le VIH et le VIS (Veazey et al., 2000; Siliciano et al., 2003).

Les PBMC activées par la concanavaline A et les lignées de cellules félines IL-2 dépendantes incluant FET-1 (Yamamoto et al., 1991), MYA-1 (Miyazawa et al., 1989), FCD4E (English et al., 1993), 104C-1 (de Parseval et al., 2004) et les cellules MCH5-4 (Lerner et al., 1998) ont été montrées comme hautement permissives pour la propagation de différentes souches du VIF (souches biologiques et clones moléculaires). Des souches CD134 indépendantes peuvent être cultivées dans des lignées de cellules félines adhérentes telles que les cellules rénales félines de Crandell ou « CrFK pour *Crandell feline kidney cells* », les G355-5 (astrocytes de chats) et des lignées de cellules T félines IL-2 indépendantes (Phillips et al., 1990).

Le génome du VIF est similaire à celui des autres lentivirus. Le génome proviral constitué de trois cadres de lecture ouverts codant pour *gag*, *pol* et *env* est encadré par deux LTR. Le génome contient aussi plusieurs autres petits cadres de lecture ouverts codant pour des protéines de régulation et accessoires. Seuls les gènes *rev*, *vif* et *orf-A* ont été identifiés (Gemeniano et al., 2003). Il a d'abord été suggéré que la protéine Orf-A jouerait un rôle de transactivateur comme Tat. Cependant, les recherches ont montré que son rôle s'apparente plutôt à celui de Vpr (Gemeniano et al., 2004).

La protéine Rev du VIF possède un poids moléculaire de 23 kDa et est exprimée à partir de deux exons dérivés de la région L du gène *env* et de la région H qui débute à l'extrémité 3' du gène *env* et s'étend jusque dans la région U3 du LTR (Phillips et al., 1992). Tout comme pour la protéine Rev du VIH-1, la Rev du VIF est une protéine nucléolaire qui se lie au RRE des ARNm viraux partiellement et non épissés afin de promouvoir leur exportation vers le cytoplasme pour leur traduction. Cette interaction accroît aussi la stabilité des ARNm et la traduction des protéines (Kiyomasu et al., 1991; Tomonaga et al., 1993). La protéine Rev du VIF contient, tout comme les autres Rev, un domaine basique situé dans le deuxième exon et servant de domaine de liaison à l'ARN et plus particulièrement au RRE.

Contrairement à la protéine Rev du VIH-1, le domaine d'activation de la protéine Rev du VIF situé immédiatement après le domaine basique contient un signal d'exportation nucléaire qui diffère grandement dans la séquence en acides aminés de ceux décrits pour les lentivirus des primates et des ongulés (Mancuso et al., 1994; Otero et al., 1998). Le NES de la protéine Rev du VIF ne présente pas de résidus hydrophobiques organisés et un cœur tétramère qui sont des propriétés définissant le NES de la protéine Rev du VIH-1 (Hope, 1997). Le NES du VIF est plutôt caractérisé par des résidus basiques et des leucines dispersées comme pour VAIE. Cependant, le domaine effecteur de ces deux protéines Rev peut remplacer le domaine effecteur de la Rev du VIH-1 suggérant que les protéines utilisent les mêmes voies cellulaires pour leur activité (Mancuso et al., 1994).

L'exportation de la protéine Rev est inhibée par la leptomycine B. Cette drogue bloque l'interaction entre le NES de la protéine Rev du VIH-1 et Crm1 (Otero et al., 1998). La sortie

de Rev au cytoplasme est donc dépendante de la protéine Crm1. La protéine Rev du VIF, comme celle du VIH-1, peut aussi interagir avec le facteur d'initiation eucaryotique 5A ou « eIF-5A pour eukaryotic initiation factor 5A ». Ce facteur a été associé à l'exportation par Rev des ARNm viraux partiellement et non épissés (Schatz et al., 1998; Hart et al., 2002).

1.4. La protéine Rev

Des phénotypes atténués de Rev ont été identifiés durant la phase asymptomatique d'une infection par le VIH-1. Cela suggère que des variations génétiques dans la protéine Rev pourraient altérer la réplication du virus *in vivo* et avoir un impact sur l'issue de l'infection. Par contre, on ne sait pas si cette mutation affecte réellement le niveau de réplication *in vivo*. Aussi, les mutations sont fréquentes chez le VIH-1. Si une mutation confère un mince avantage à un mutant, celui-ci deviendra rapidement dominant. Par conséquent, si un changement dans la séquence du domaine d'activation limite le niveau de réplication d'un mutant, celui-ci devrait subir une sélection négative (Hua et al., 1996).

1.4.1. Domaines fonctionnels

La protéine Rev des lentivirus possède généralement trois principaux domaines fonctionnels qui lui permettent d'accomplir ses fonctions. Le premier domaine, le domaine de multimérisation, est généralement riche en résidus hydrophobes impliqués dans la structure tridimensionnelle de la protéine ou dans l'interaction entre deux protéines Rev (DiMattia et al., 2016). Ce domaine peut être monopartite ou bipartite selon le virus. Pour pouvoir exporter les ARN viraux portant un RRE, Rev doit pouvoir former minimalement un dimère sans quoi le complexe Rev-RRE ne peut interagir avec l'exportine Crm1 et ne sera donc pas exporté en dehors du noyau. Le domaine de multimérisation est donc très important.

Un deuxième domaine composé généralement de plusieurs résidus basiques et plus particulièrement d'arginine est appelé ARM pour « arginine Rich Motif ». Ce domaine

contient deux régions importantes, soit le domaine de liaison à l'ARN (RBD pour « RNA Binding Domain ») et le signal de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear Localization Domain ») qui permet à la protéine Rev d'entrer dans le noyau de la cellule hôte. Un signal de localisation nucléolaire (NoLS pour « Nucleolar Localisation Signal ») est souvent associé au NLS et permet à la protéine de se localiser au nucléole. Le RBD est généralement superposé au NLS et s'étend au-delà du NLS. De cette façon, lorsque la protéine lie le RRE des ARNs viraux non épissés, le NLS est masqué évitant ainsi que le complexe ne retourne dans le noyau après son exportation.

Le dernier domaine appelé domaine d'activation est généralement riche en leucines ou parfois d'autres résidus hydrophobes. Il porte le signal d'exportation nucléaire (NES pour « Nuclear Exportation Signal ») (Daelemans et al., 2004). Les séquences consensus du NES dépendant de Crm1 étaient autrefois classées en deux types, soit le type Rev du VIH-1 ou le type PKI (Güttler et al., 2010; Gomez Corredor and Archambault, 2012). D'autres classifications ont tenté d'élargir ces classes pour intégrer les différents NES caractérisés. Toutefois, il semble impossible de classer les NES en fonction de leur séquence, car il existe trop de variabilité. Une classification basée sur la structure des NES plutôt que leur séquence semble plus juste bien que plus complexe à réaliser.

La protéine Rev du VIH-1 contient aussi un signal d'inhibition nucléaire ("Nuclear inhibition signal" ou NIS) qui sert à maintenir sa distribution dans le noyau et par conséquent sa propre activité (Suhasini and Reddy, 2009). Au niveau de la nomenclature, certains auteurs parlent de rétention et d'autres de localisation. Il est parfois difficile de faire la différence et ces termes sont parfois utilisés pour décrire la même chose.

L'organisation fonctionnelle de la protéine Rev diffère d'un virus à l'autre. Chez le VIH-1, le NES est localisé entre les aa 73 à 83, le NLS entre les aa 35 à 46 et le domaine de multimérisation entre les aa 12 à 22 et 52 à 60 (Böhnlein et al., 1991; Bogerd and Greene, 1993; Fischer et al., 1995; Meyer et al., 1996; Pollard and Malim, 1998; Jain and Belasco, 2001). Chez le VAIE, le NES se situe entre les aa 31 à 55 et le NLS entre les aa 144 à 165 (Lee et al., 2006). Pour le VIB, le NES se situe entre les aa 109 à 121 et le NLS entre les aa 71

à 74 et 95 à 101 (Gomez Corredor and Archambault, 2009; Gomez Corredor and Archambault, 2012). Pour ces deux derniers virus, le domaine de multimérisation n'est pas connu ou n'a pas été complètement caractérisé respectivement (Marchand, 2015). D'autres protéines apparentées à Rev (Rev-like) possèdent aussi ces domaines fonctionnels. Pour les autres lentivirus présentés à la figure 1.5, les domaines fonctionnels sont prédits par homologie de séquence. La protéine Rex du virus de la leucémie des cellules T humaine (« Human T-cell leukemia virus » de type 1 ou HTLV-1) possède un NLS situé entre les aa 1 à 19 et un NES entre les aa 79 à 99. Elle possède aussi un domaine de multimérisation bipartite situé entre les aa 57 à 66 et 106 à 124 (Heger et al., 1998). Finalement, le rétrovirus endogène humain K (« Human endogenous retrovirus K » ou HERV-K) possède aussi une protéine avec une fonction similaire à Rev appelée Rec. Son NLS est situé entre les aa 13 à 20 et son NES entre les aa 53 à 59. Elle possède un seul domaine de multimérisation connu situé entre les aa 75 à 87 (Boese et al., 2001).

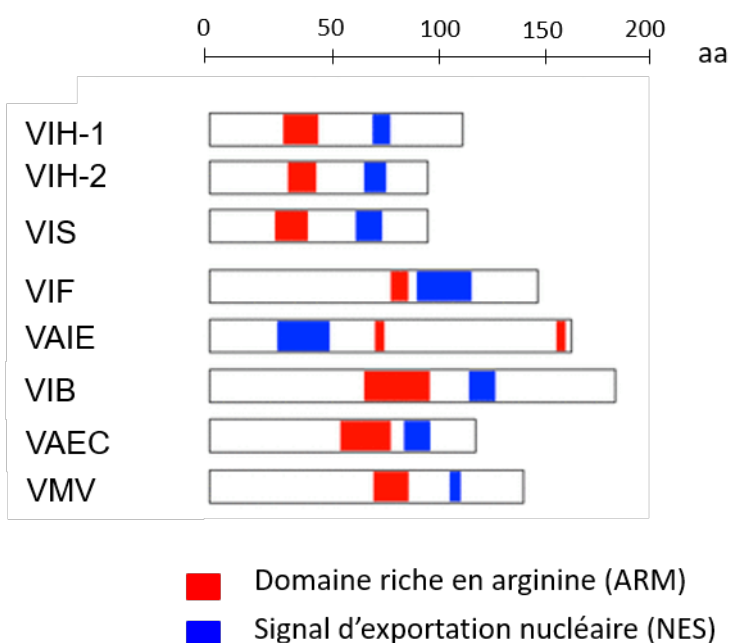


Figure 1.5. Localisation des domaines fonctionnels connus ou prédits des différentes protéines Rev. Adaptée de Umnakwe et al., 2017.

Pour la protéine Rev du VIH-1, le signal d'inhibition de diffusion nucléaire (NIS) est situé entre les acides aminés 10 et 24 de l'extrémité N-terminale de Rev

(EDLLKAVRLIKFLYQ). Cette séquence correspond aussi au premier domaine de multimérisation (Kubota and Pomerantz, 1998). En absence du NIS, Rev est relocalisée en majorité dans le cytoplasme et est dégradée plus rapidement (Kubota and Pomerantz, 2000).

1.4.2. Les différents rôles de la protéine Rev

La protéine Rev exerce plusieurs rôles lors d'une infection par le VIH-1. Elle joue un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique, la polyadénylation et la stabilité des ARN viraux en plus d'être impliquée dans la traduction et l'encapsidation (Blissenbach et al., 2010). Généralement, l'interaction de Rev avec des protéines cellulaires entraîne une cascade d'effets post-transcriptionnels dont l'inhibition de l'épissage des ARN viraux, l'activation de l'exportation nucléaire des ARN non épissés et une utilisation appropriée des ARN portant le RRE pour la traduction cytoplasmique (Suhasini and Reddy, 2009).

Dans les cellules infectées, le niveau d'ADN viral non intégré peut aller jusqu'à 99%. Sur les 15 à 21 copies présentes dans la cellule, seulement une ou deux seront intégrées. Il a été montré que la protéine Rev est responsable de ce faible niveau d'intégration. La protéine Rev est produite en petite quantité durant la phase précoce de l'infection avant même que l'ADN viral soit intégré au génome de l'hôte à partir d'ADN viral non intégré. Pour permettre l'intégration du provirus, l'intégrase virale (IN) interagit avec la protéine LEDGF/p75 ("lens epithelium-derived growth factor") et forme le complexe LEDGF/p75-IN. Rev entraîne la dissociation de ce complexe et se lie à l'IN bloquant l'interaction avec l'ADN et la reformation du complexe (Levin, Rosenbluh et al., 2010). Il est possible que ce mécanisme ait pour but d'éviter un trop grand nombre d'intégrations dans le génome de l'hôte, car une importante altération dans l'ADN pourrait déclencher un mécanisme d'apoptose chez la cellule hôte. Une étude a montré que le contrôle Rev-dépendant de l'intégration de l'ADNc du VIH est impliqué dans la résistance aux surinfections. En effet, ce mécanisme bloque l'intégration d'ADNc supplémentaire lors d'une seconde infection par le même virus ou un virus apparenté (Levin et al., 2010).

Le rôle le plus étudié (et possiblement le plus important) de la protéine Rev est celui qu'elle joue au niveau du transport nucléo-cytoplasmique. Au contraire des ARNm cellulaires, les ARNm rétroviraux évitent le couplage étroit qui existe entre l'épissage et l'exportation nucléaire ce qui permet aux transcrits contenant des introns d'être exportés au cytoplasme. Les lentivirus possèdent un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des gènes qui permet la formation des protéines virales de structure et de régulation de manière différente. Le mécanisme consiste en un système d'épissage complexe permettant de générer plusieurs espèces d'ARNm codant pour une variété de protéines virales à partir d'un seul transcrit. Les transcrits précoces sont complètement épissés et codent pour les protéines de régulation dont Tat et Rev. Les transcrits tardifs partiellement ou non épissés codent pour les protéines retrouvées dans les particules matures telles que Gag, Pol et Env ainsi que l'ARN génomique. Afin de transporter les ARN partiellement et non épissés du noyau vers le cytoplasme, la protéine Rev, après sa synthèse, retourne au noyau via son NLS. Elle se lie alors à une structure secondaire des ARN viraux, le RRE. Le complexe interagit ensuite avec l'exportine Crm1 pour être exporté vers le cytoplasme. Les ARN partiellement épissés seront traduits pour former des protéines structurales et enzymatiques alors que les ARN non épissés représentent l'ARN génomique viral qui sera encapsidé lors de l'assemblage des nouveaux virions (Pollard and Malim, 1998; Yi et al., 2002). Par conséquent, en l'absence de Rev ou d'une protéine Rev fonctionnelle, la réplication virale sera bloquée au stade précoce.

La protéine Rev peut aussi agir à différentes étapes de la réplication virale. Au niveau de la traduction, le complexe Rev-RRE interagirait avec le facteur d'initiation eucaryotique 5A (eIF5A). Des versions mutantes d'eIF5A bloquant son interaction avec Rev ont prévenu la réplication du VIH-1 dans des cellules humaines (Groom et al., 2009). Rev peut aussi interagir avec les microtubules et induire leur déstabilisation en créant des anneaux à leurs extrémités. La protéine a montré un fort effet inhibiteur sur la formation d'asters dans des extraits d'œuf de *Xenopus* démontrant sa capacité à interagir avec la tubuline en présence de niveaux normaux de constituants cellulaires. Cet effet coïncide avec la rupture des microtubules observée suite à une infection par le VIH-1 (Watts et al., 2000). Il reste toutefois à découvrir comment la dépolarisation des microtubules peut être profitable à l'infection.

1.4.3. Multimérisation de Rev et liaison au RRE

Le RRE est un élément hautement structuré situé généralement dans la région du gène *env* du génome viral. Cette structure est présente sur tous les ARNm viraux partiellement et non épissés et est extrêmement conservée à travers les différentes souches d'un lentivirus donné. Il n'y a pas de conservation au niveau de la séquence ARN composant les différents RRE lentiviraux. Cependant, le RRE de plusieurs génomes lentiviraux est retrouvé à la jonction SU/TM du gène de l'enveloppe (Figure 1.6) (Le et al., 1990; Tiley and Cullen, 1992, Lee et al., 2008). De plus, les éléments structuraux secondaires de l'ARN semblent conservés entre les différents lentivirus (Lesnik et al., 2002). Le RRE du VIH-1 est situé à la jonction des domaines SU (GP120) et TM (gp41) du gène *env* (Le et al., 1990). Chez le VIB, la séquence formant le RRE est de 312 paires de bases et se situe entre les acides aminés (aa) 6992 et 7303 situés dans le gène de l'enveloppe (Molina et al., 2002). Le RRE du VAIE diffère des autres. Il est situé à l'extrémité 5' du gène de l'enveloppe et fait environ 555 nucléotides. Cette région du génome code pour l'exon 3 de la protéine Tat et Rev (Belshan et al., 2000, Lee et al., 2008). Seul le RRE du JDV n'a pas été identifié encore.

L'interaction de Rev avec le RRE se fait par le domaine de liaison à l'ARN (RBD) présent sur la protéine (Cullen, 1991). Ce domaine est riche en résidus arginine ou lysine, ce qui lui confère une charge positive favorisant les interactions avec l'ARN dont le squelette est composé de groupements phosphates lui conférant plutôt une charge négative. Ensuite, le NES recrute la protéine Crm1 ainsi que Ran couplé au GTP (RanGTP) afin de permettre l'exportation des ARN viraux (Fischer et al., 1995). Il a été montré que le complexe Rev-RRE forme un complexe avec une forme dimérique de Crm1 (Booth et al., 2014). Le remodelage des oligomères de Rev par le RRE permettrait d'orienter le NES de Rev afin d'augmenter son avidité pour le dimère de Crm1 facilitant ainsi son transport vers le cytoplasme (Jayaraman et al., 2014). Le séquençage de Rev et du RRE chez différents patients infectés par le VIH-1 et ce à différents moments de l'infection a montré que le RRE est utilisé pour moduler l'infection. L'activité du RRE s'est avérée plus sensible aux variations de séquences que l'activité de Rev. Les différents RRE ont aussi montré des différences dans la multimérisation de Rev. Les résultats indiquent que le système utilisant le complexe Rev-RRE peut varier son

efficacité afin de possiblement contrôler la réplication (Sloan et al., 2013).

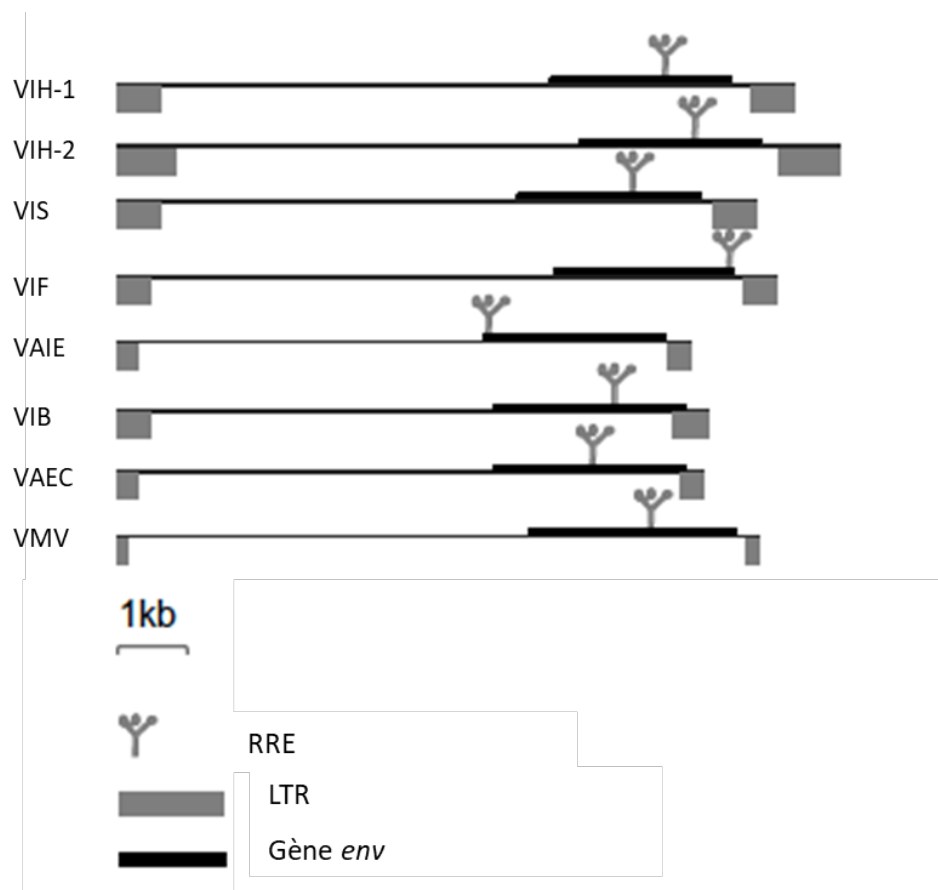


Figure 1.6. Localisation du RRE des différents Lentivirus. Adaptée de Umunnakwe et al., 2017.

Différentes théories existent concernant la multimérisation de Rev et sa liaison au RRE. Certains soutiennent que Rev forme des multimères qui se lient ensuite au RRE (Malim and Cullen, 1991) alors que d'autres soutiennent que Rev se lie au RRE et recrute ensuite d'autres protéines pour former des multimères (Olsen et al., 1990). Il semble que ces deux événements, soit la liaison au RRE et la multimérisation, soient distincts l'un de l'autre. Cependant, la capacité de former des multimères est déterminante dans la stabilité de la liaison au RRE. La protéine Rev doit donc être capable de former des multimères et doit pouvoir se lier au RRE pour accomplir sa fonction de transport des ARN viraux (Hoffmann et al., 2012). Une première protéine Rev se lie sur un site de haute affinité du RRE appelée tige-boucle IIB via son domaine riche en résidus arginine (ARM) qui contient le RBD. Le deuxième

monomère se fixe sur un site adjacent de faible affinité appelé tige IIA. L'interaction entre les deux monomères pour former un dimère stabilise la liaison au site de faible affinité. D'autres monomères viennent s'ajouter de la même façon sur les autres sites disponibles. Une fois que tous les sites sont occupés (jusqu'à treize molécules de Rev ont été observées sur un même RRE), Rev peut alors passer du noyau vers le cytoplasme transportant avec elle l'ARN viral. La liaison d'un monomère seul avec le site de haute affinité n'est pas suffisante pour diriger l'exportation de l'ARN *in vivo* (Jain and Belasco, 2001). Il a été récemment montré que minimalement deux protéines Rev doivent être recrutées au niveau du RRE pour que le complexe d'exportation soit fonctionnel (Hoffmann et al., 2012).

Les expériences de Jain et Belasco (2001) ont montré que les protéines Rev déficientes pour un des deux domaines de multimérisation arrivaient tout de même à former des dimères. Cela a permis de déterminer que la protéine Rev présentait deux domaines de multimérisation différents qui interagissent avec leur domaine homologue sur une seconde protéine Rev. La cristallisation de la protéine Rev a permis d'élaborer de nouveaux modèles de multimérisation plus complexes (Fernandes et al., 2012). Puisque la voie d'exportation dépendante de Rev est essentielle à la réplication du virus, trouver un moyen de bloquer l'interaction entre Rev et le RRE pourrait représenter une cible intéressante pour le développement de stratégies antivirales.

1.4.4 Les autres protéines Rev

Tous les lentivirus expriment une protéine Rev avec une fonction d'exportation similaire à celle du VIH-1. Les deltarétrovirus possèdent aussi une protéine analogue. Ces protéines sont dites « rev-like ». Malgré que la fonction d'exportation semble bien conservée à travers les différentes protéines Rev et Rev-like, elles ne sont pas nécessairement identiques dans toutes leurs autres fonctions (Tiley and Cullen, 1992). En effet, plusieurs Rev présentent des différences dans l'organisation de leurs domaines fonctionnels, dans leur séquence et parfois même dans leur fonctionnalité. Par exemple, la protéine Rev du VAIE joue un rôle dans l'épissage alternatif de son propre ARN (Martarano et al., 1994; Tan et al., 1996; Rosin-

Arbesfeld et al., 2000). À la vue de ces différences, il n'est pas étonnant que Rev, bien qu'elle soit conservée, puisse avoir d'autres fonctions encore inconnues et propres à chaque lentivirus.

1.5. Transport nucléaire

Tel que mentionné précédemment, Rev doit pouvoir transiter entre le noyau et le cytoplasme des cellules afin d'assurer le transport des ARN viraux. La présente section porte donc sur les différents mécanismes qui permettent les échanges nucléo-cytoplasmiques. Les organismes eucaryotes subdivisent leurs cellules en compartiments qui mènent des tâches spécifiques. Par exemple, le noyau cellulaire héberge le génome et gère l'information génétique, alors que le cytoplasme environnant est spécialisé dans la fabrication de protéines. Ces protéines sont ensuite utilisées dans le cytoplasme ou transportées vers le noyau et d'autres compartiments cellulaires. Comme les protéines ne sont pas fabriquées dans le noyau, toutes les protéines de ce compartiment doivent être importées du cytoplasme.

Le noyau s'est spécialisé dans la réplication et la réparation de l'ADN, l'assemblage des nucléosomes, la transcription, l'assemblage des ribosomes, ainsi que dans l'épissage et le traitement des ARNm. Une telle spécialisation repose de manière critique sur une séparation spatiale des activités interférentes. La synthèse des protéines intranucléaires, par exemple, serait un processus particulièrement inutile et coûteux pour la cellule, car les ribosomes traduiraient également des ARNm non épissés ou incomplètement épissés, par conséquent lus dans les introns, ajouteraient des résidus inappropriés aux chaînes naissantes, rencontreraient finalement des codons d'arrêt prématurés et produiraient ainsi des fragments de protéines. Par conséquent, le noyau ne peut effectuer la synthèse de protéines et dépend donc de l'importation de protéines du cytoplasme. Inversement, le noyau fournit le cytoplasme en produits nucléaires tels que les sous-unités ribosomales nouvellement assemblées, les ARNt et les ARN messagers (Stevens and Swift, 1966).

Deux couches de membrane séparent le noyau et le cytoplasme. Tout échange de matériel doit donc passer par des canaux appelés complexes de pores nucléaires ou CPN. Les CPN disposent de mécanismes qui permettent uniquement aux petites molécules un transit libre, tandis que les plus grandes (plus de 5 nm de diamètre ce qui correspond à une protéine sphérique d'environ 40 kDa) sont généralement rejetées (Mohr et al., 2009). Cependant, des protéines plus importantes peuvent également traverser rapidement les complexes de pores nucléaires lorsqu'elles sont chargées sur des molécules servant de navettes appelées exportines. Ces récepteurs de transport nucléaire (RTN) ou karyophérines transportent les protéines hors du noyau via les CPN par translocation facilitée (Krebs et al., 2001).

La barrière de perméabilité est formée de domaines répétés F/G (phénylalanine et glycine) des nucléoporines (Patel et al., 2007). Les RTN possèdent plusieurs sites de liaison pour ces motifs répétés (Isgro and Schulten, 2005) Cette interaction permet aux RTN d'outrepasser la limite de taille et de traverser le CPN en quelques millisecondes (Grünwald and Singer, 2010). Les eucaryotes complexes possèdent un système de transport comprenant environ 80 facteurs différents pour accomplir cet échange (Stewart, 2007). Ces facteurs peuvent être regroupés en 3 groupes fonctionnels dont les nucléoporines qui forment le CPN, les récepteurs de transport nucléaire et les molécules adaptatrices et finalement les composants qui fournissent l'énergie métabolique nécessaire au transport (Görlich and Kutay, 1999).

1.5.1. Importation nucléaire

Dans les cellules eucaryotes, la machinerie transcriptionnelle et le matériel génétique sont situés dans le noyau alors que la machinerie traductionnelle se situe dans le cytoplasme. Cette séparation a pour but de faciliter la régulation des différents processus cellulaires par la régulation sélective du transport bidirectionnel entre les deux compartiments. Il existe donc une machinerie moléculaire capable de reconnaître la cargaison dans un compartiment, de le faire traverser le pore nucléaire et de le relâcher dans un autre compartiment (Lange et al., 2007). Cette voie est facilitée par des protéines de transport solubles appelées karyophérines (Radu et al., 1995). Celles impliquées dans l'importation au noyau sont appelées importines alors que celles impliquées dans l'exportation cytoplasmique sont appelées exportines.

Plusieurs récepteurs de transport font partie de la famille des importines β . Dans la voie classique, bien que les protéines puissent interagir directement avec l'importine β , l'interaction entre les deux molécules est réalisée par la présence d'une petite molécule adaptatrice, l'importine α . Il a été montré que la présence d'un adaptateur dans le système de transport peut diminuer son efficacité bien que cela permet à la cellule un plus grand contrôle du taux d'importation nucléaire (Riddick and Macara, 2007).

Pour assurer le transport des protéines via la voie classique, il faut de l'énergie. Cette énergie est fournie par du GTP, ainsi que la présence spécifique de la petite protéine G Ran, comme facteur utilisateur du GTP. Ran étant une GTPase, elle oscille entre la forme couplée GTP et GDP. Ran est majoritairement sous forme GDP dans le cytoplasme. Lorsqu'elle est importée dans le noyau, une protéine de régulation nucléaire (RCC1 ou RanGEF pour « Ran guanosine exchange factor ») relâche le GDP et le remplace par un GTP. Inversement, lorsque RanGTP est exportée dans le cytoplasme, une protéine de régulation cytoplasmique (RanGAP pour « Ran GTPase-activating protein ») active l'activité GTPase de Ran qui convertit alors le GTP en GDP. On retrouve donc davantage de RanGDP dans le cytoplasme et de RanGTP dans le noyau (Kalab et al., 2002).

Bien qu'il existe plusieurs voies de transport nucléo-cytoplasmique, la voie classique, utilisée par l'antigène grand T du virus simien 40 (SV40), est la mieux connue jusqu'ici. Dans cette voie, l'importine α reconnaît et lie une protéine dans le cytoplasme puis le complexe se lie à l'importine β . L'importine β assure alors l'interaction du complexe avec le CPN pour être transloquée dans le noyau. Une fois dans le noyau, le complexe est dissocié par RanGTP. En effet, la liaison de RanGTP à l'importine β entraîne un changement de conformation qui permet le relâchement du complexe protéine-importine α (Lee et al., 2005). Cette étape est suivie par une interaction avec le domaine IBB (importin- β binding) de l'importine α , la nucléoporeine Nup50 et le récepteur d'exportation de l'importine α (CAS/RanGTP) qui permet la livraison de la protéine dans le noyau. Le complexe CAS/RanGTP va ensuite recycler l'importine α en la ramenant dans le cytoplasme (Kutay et al., 1997).

1.5.2. Le signal de localisation nucléaire

Pour être importées efficacement au noyau, les protéines dépassant généralement les 40 kDa doivent posséder un signal de localisation nucléaire (NLS). Il n'existe pas de consensus s'appliquant à toutes les séquences NLS, mais elles ont en commun d'être constituées d'un grand nombre d'acides aminés basiques tels que les arginines et les lysines. Le NLS est reconnu par une importine. Le NLS peut être monopartite s'il est composé d'une seule séquence basique ou bipartite s'il est composé de deux séquences basiques séparées par une séquence d'espacement. Deux exemples très étudiés sont le NLS monopartite de l'antigène grand T du SV40 et le NLS bipartite de la nucléoplasmine (Dingwall et al., 1991).

Le NLS prototype de l'antigène grand T du SV40 (¹²⁶PKKKRRV¹³²) est caractérisé par une courte séquence d'acides aminés basiques consécutifs. On retrouve dans cette famille la protéine Rev du VIH-1 et du VAIE ainsi que les protéines Rex et Rec du HTLV-1 et HERV-K respectivement. Le type bipartite a d'abord été caractérisé chez la nucléoplasmine de *Xenopus*. Sa séquence est composée de deux résidus basiques suivis de dix résidus d'espacement et puis d'une seconde région basique de quatre acides aminés (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰). Le type bipartite se divise en trois catégories : type court, long et non classé. Pour le type court, la séquence d'espacement entre les deux régions basiques est composée de 8 à 16 acides aminés. Le NLS de la nucléoplasmine en fait partie. Pour le type long, la séquence d'espacement est composée de 30 à 32 acides aminés. Les NLS non classés possèdent une séquence d'espacement d'une vingtaine d'acides aminés et n'appartiennent donc à aucun des deux autres groupes. La protéine Rev du VIB appartient à ce groupe avec une séquence d'espacement de 20 acides aminés dans laquelle se trouve le signal de localisation nucléolaire (Romanelli and Morandi, 2002; Gomez Corredor and Archambault, 2009). Seul le NLS du JDV n'est ni étudié, ni prédit. Le NLS du VIF et du VAEC sont prédits par homologie avec les autres lentivirus.

La protéine Rev du VIH-1 peut lier l'importine β directement sans l'aide des importines α . L'importation de Rev débute lorsque son NLS lie l'importine β (Fankhauser et al., 1991). Le complexe combiné au Ran-GDP est alors transloqué vers le noyau à travers le

pore nucléaire. Dans le noyau, Ran-GDP est converti en Ran-GTP par RCC1. Rev est alors dissociée de l'importine β qui peut retourner au cytoplasme. La formation du complexe Rev-RRE masque le NLS (Fineberg et al., 2003). La portion N terminale de Rev reconnaît le RRE via un domaine riche en arginine, le RBD, bordé par des domaines hydrophobes qui facilitent l'oligomérisation de Rev sur le RRE (Malim and Cullen, 1991). Le remodelage des oligomères de Rev par le RRE servirait à organiser le NES afin d'augmenter leur avidité pour la protéine Crm1 dimérique facilitant ainsi son exportation (Booth et al., 2014). Ensuite, le NES situé à l'extrémité C terminale de la protéine recrute le dimère de Crm1 associé à Ran couplé à une GTP (Ran-GTP) (Fischer et al., 1995).

1.5.3. Exportation nucléaire

Crm1 (aussi appelée Xpo1) est une exportine hautement conservée, contrôlée par la RanGTPase qui a pour rôle de transporter des protéines et des ribonucléoprotéines (RNP) du noyau vers le cytoplasme (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997). Une étude a révélé qu'un nombre remarquablement important de protéines différentes (environ 1000) sont exportées par Crm1 dans les cellules humaines. Toutefois, la plupart de ces protéines ne sont pas censées quitter le cytoplasme. Il semble donc que ces protéines peuvent fuir dans le noyau, mais que Crm1 les reconnaît comme des protéines cytoplasmiques et les expulse du noyau (Kırlı et al., 2015).

1.5.4. Le signal d'exportation nucléaire

Crm1 reconnaît sa cargaison par une courte séquence appelée signal d'exportation nucléaire ou NES. Cette séquence est généralement composée de 4 ou 5 résidus hydrophobiques (souvent Leucine, Valine, Isoleucine ou Méthionine marquée par un Φ 0 à Φ 5) espacés de façon caractéristique. Ces résidus lient les poches hydrophobes (marquées P0 à 4) de la protéine Crm1 (Fung et al., 2017). Les NES sont classés selon ces séquences d'espacement actuellement décrit par 10 motifs consensus correspondant aux classes 1a, 1b, 1c, 1d, 2, 3, 1a-R, 1b-R, 1c-R et 1d-R (Fung et al., 2017). Deux NES classiques sont souvent

utilisés à titre de comparaison. Il s'agit du NES de type PKI pour « protein kinase A inhibitor » (LALKLAGLDI) et du NES de la protéine Rev du VIH-1 (LPPLERLTL) (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Ces NES classiques sont riches en leucines.

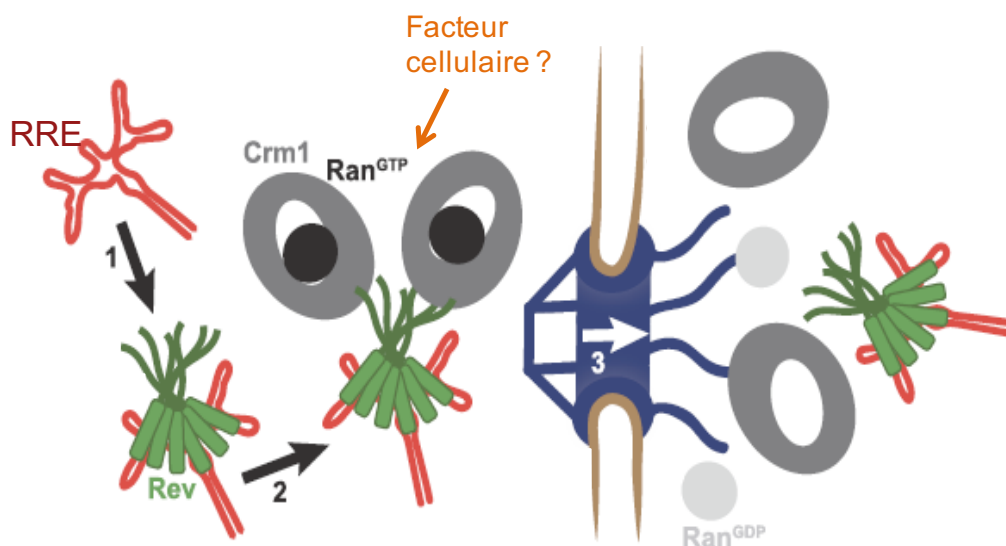


Figure 1.7. Modèle d'exportation de l'ARN viral par le complexe Rev-RRE-Crm1.

Dans le noyau, la protéine Rev lie le RRE des ARN viraux non épissés ce qui expose son NES afin qu'il soit reconnu par le complexe Crm1-RanGTP. Un minimum de deux Rev doivent être associées afin de lier le dimère de Crm1. Le complexe est transporté vers le cytoplasme où l'hydrolyse de RanGTP en Ran GDP entraîne la dissociation du complexe Rev-RRE-Crm1. *Adapté de Booth, Cheng et Frankel, 2014.

Il existe une classe spéciale de séquences qui permettent l'accumulation de protéines dans le nucléole. Ces séquences portent le nom de séquences de rétention nucléolaire (NoRS). On parle parfois aussi de séquence de localisation nucléolaire (NoLS). De telles séquences ont été décrites pour diverses protéines animales, végétales ou virales. Ces séquences sont riches en acides aminés chargés positivement, principalement des lysines et des arginines comme pour le NLS. Les NoRS sont par conséquent souvent retrouvés à l'intérieur même des NLS. Jusqu'à maintenant, il n'existe pas vraiment de consensus contrairement aux NLS (Musinova et al., 2011).

1.5.5. Rev et le nucléole

Le nucléole est une organelle dépourvue de membrane qui constitue le site de biogenèse des ribosomes et agit aussi à titre de détecteur de stress cellulaire. Le nucléole se détaille en trois structures dans la plupart des cellules mammifères, soit du centre vers l'extérieur le composant fibrillaire dense (CFD), le centre fibrillaire (CF) et le composant granulaire (CG) (Boisvert et al., 2007). De petites séquences basiques riches en résidus arginine et lysine (les NoLS) sont nécessaires pour assurer la localisation d'une protéine au nucléole (Scott et al., 2010).

Le complexe Rev-RRE interagit aussi avec différentes hélicases ARN retrouvées dans le nucléole (Groom et al., 2009). Cependant, Rev ne semble pas moduler le rôle des hélicases, mais tire plutôt profit de ces dernières. Par exemple, DDX1 lie le complexe Rev-RRE et augmente leur activité (Sahasini and Reddy, 2009). La liaison de DDX1 au RRE mène à un changement structural de l'ARN au niveau de la structure de la tige II. Cette modification entraîne une augmentation de la multimérisation de Rev au RRE. DDX1 agirait donc comme une chaperone ARN (Hammond et al., 2017). DDX3 agit plutôt en liant la protéine Crm1 augmentant ainsi l'activité Rev/Crm1 par un mécanisme inconnu facilitant l'exportation du complexe Rev-RRE. Elle permet par conséquent d'augmenter l'accumulation cytoplasmique des ARNm viraux. La protéine DDX5 joue aussi un rôle dans l'interaction Rev-RRE. Une mutation dans l'hélicase DDX5 bloquant son interaction avec Rev mène à une réduction de la réplication du VIH-1 (Zhou et al., 2013). La protéine DDX24 peut aussi interagir avec la protéine Rev. Cependant, cette interaction serait bénéfique plus tard dans le cycle de réplication, soit lors de l'empaquetage des ARN viraux (Sahasini and Reddy, 2009). Une interaction entre Rev et la protéine hRIP ("Human Rev interacting protein") favorise le relâchement des ARN du VIH-1 de la région périnucléaire (Sahasini and Reddy, 2009). D'autres interactions ont été observées avec des ribonucléoprotéines, mais le rôle précis de ces interactions demeure encore nébuleux (Hadian et al., 2009). Il semble donc que la présence de Rev au nucléole soit avantageuse pour la réplication du virus.

1.6. Hypothèses et objectifs

Tous les lentivirus codent pour une protéine Rev ou Rev-like dont le rôle est d'exporter les transcrits d'ARN viraux partiellement et non-épissés servant à produire les virions. La protéine Rev possède donc des domaines fonctionnels lui permettant d'entrer dans le noyau de façon active, de s'y accumuler et d'en ressortir lorsque liée à l'ARN viral. Ces domaines sont le NLS, le NoLS et le NES.

Dans ce contexte, nous avons donc émis l'hypothèse que les protéines Rev du JDV et du VIF possèdent toutes deux de tels domaines fonctionnels leur permettant d'entrer au noyau, de s'accumuler au niveau du nucléole ainsi que d'en ressortir, et ce, de façon active. Nous croyons que ces domaines présentent des différences avec les domaines équivalents déjà décrits dans la littérature pour d'autres lentivirus. Nous avons aussi émis l'hypothèse que le transport nuco-cytoplasmique de Rev, malgré sa petite taille, se fait de façon active comme pour la protéine Rev du VIH-1 et implique la voie classique d'importation comme pour la protéine Rev du VIB. Finalement, nous avons émis l'hypothèse que la protéine Rev s'accumule au noyau par une interaction avec la protéine B23 et la nucléoline, deux protéines majeures du nucléole.

L'objectif général de mon projet de thèse était donc de localiser les domaines fonctionnels non caractérisés pour la protéine Rev de JDV et de VIF. Plus spécifiquement, le premier objectif était de localiser et de caractériser le NLS et le NES de la protéine Rev du JDV ainsi que pour celle du VIF. Par la suite, le second objectif était de déterminer la ou les voies d'importation empruntées par la protéine Rev de ces virus. Le dernier objectif consistait à identifier des partenaires d'interaction de la protéine Rev dans le nucléole.

Chapitre II: Le virus de la maladie de Jembrana: identification de nouveaux signaux de localisation nucléaire/nucléolaire et d'exportation nucléaire chez les lentivirus

L'objectif général de ce chapitre était de localiser le NLS, le NoLS et le NES de la protéine Rev du JDV. La composition en acides aminés de chacun de ces domaines a ensuite été déterminée à l'aide de plusieurs mutants de la protéine Rev.

Ce chapitre présenté sous forme d'un article scientifique a été publié dans la revue « *PLOS One* » le 22 août 2019. La conception et la réalisation des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse (Claude Marchand). La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Les professeurs Guy Lemay et Denis Archambault ont contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant leur expertise scientifique avisée et leurs commentaires judicieux. Le Pr Denis Archambault a contribué à la conception du projet, au support financier et à la rédaction et l'édition de l'article. L'ensemble des références sont présentées à la fin de la thèse.

Résumé

La protéine lentivirale Rev, qui est une protéine régulatrice essentielle à la réplication du virus, a été étudiée pour la première fois chez le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). La fonction principale de Rev est de servir d'intermédiaire pour l'exportation nucléaire d'ARN viraux. Pour remplir sa fonction, Rev fait la navette entre le cytoplasme et le noyau. Le virus de la maladie de Jembrana (JDV), un lentivirus, est l'agent étiologique de la maladie de Jembrana qui a été décrite pour la première fois chez des bovins de Bali en Indonésie en 1964. Malgré le taux de mortalité élevé associé au JDV, ce virus reste mal étudié. Ici, la distribution intra-cellulaire de JDV Rev, les signaux de localisation nucléaire et nucléolaire (NLS et NoLS, respectivement) et le signal d'exportation nucléaire (NES) de la protéine ont été examinés. La protéine Rev du JDV fusionnée à la protéine fluorescente verte (EGFP) était principalement retrouvée dans le cytoplasme et le nucléole des cellules transfectées, tel que déterminé par des analyses de microscopie à fluorescence. Grâce à la transfection d'une série de mutants de délétion de la protéine Rev du JDV, il a été possible de localiser la région du NLS / NoLS entre les acides aminés 74 à 105. En remplaçant les résidus basiques par des résidus alanine dans cette séquence, nous avons démontré que le NLS de la protéine Rev du JDV englobe les acides aminés 76 à 86, et est exclusivement composé de résidus arginine, alors qu'un NoLS bipartite a été observé pour la première fois dans toutes les protéines rétrovirales de type Rev / Rev-like. Enfin, un NES a été identifié en aval du NLS / NoLS et englobe les acides aminés 116 à 128. Le NES de la protéine Rev du JDV s'est révélé être de la classe des inhibiteurs de la protéine kinase A (PKI) au lieu de la classe Rev du VIH-1. Il correspond également à la séquence consensus la plus optimale du NES de type PKI et, en tant que tel, est nouveau parmi les NES des protéines Rev lentivirales.

The Jembrana disease virus Rev protein: Identification of nuclear and novel lentiviral nucleolar localization and nuclear export signals.

Claude Marchand^{1,2}, Guy Lemay² and Denis Archambault^{1,3}

¹Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada; ²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; ³Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines - Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2.1. Abstract

The lentiviral Rev protein, which is a regulatory protein essential for virus replication, has been first studied in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The main function of Rev is to mediate the nuclear exportation of viral RNAs. To fulfill its function, Rev shuttles between the cytoplasm and the nucleus. The Jembrana disease virus (JDV), a lentivirus, is the etiologic agent of the Jembrana disease which was first described in Bali cattle in Indonesia in 1964. Despite the high mortality rate associated with JDV, this virus remains poorly studied. Herein the subcellular distribution of JDV Rev, the nuclear and nucleolar localization signals (NLS and NoLS, respectively) and the nuclear export signal (NES) of the protein were examined. JDV Rev fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) predominantly localized to the cytoplasm and nucleolus of transfected cells, as determined by fluorescence microscopy analyses. Through transfection of a series of deletion mutants of JDV Rev, it was possible to localize the NLS/NoLS region between amino acids (aa) 74 to 105. By substituting basic residues with alanine within this sequence, we demonstrated that the JDV Rev NLS encompasses aa 76 to 86, and is exclusively composed of arginine residues, whereas a bipartite NoLS was observed for the first time in any retroviral

Rev/Rev-like proteins. Finally, a NES was identified downstream of the NLS/NoLS and encompasses aa 116 to 128 of the JDV Rev protein. The JDV Rev NES was found to be of the protein kinase A inhibitor (PKI) class instead of the HIV-1 Rev class. It also corresponds to the most optimal consensus sequence of PKI NES and, as such, is novel among lentiviral Rev NES.

2.2. Introduction

Lentiviruses constitute a distinct viral genus within the Retroviridae family which includes human (HIV), simian (SIV), feline (FIV) and bovine (BIV) immunodeficiency viruses, equine infectious anemia virus (EIAV), caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) and Maedi-Visna virus (MVV) in sheep (Narayan and Clements, 1989; Kertayadna et al., 1993). These viruses share a relatively long incubation period followed by a protracted symptomatic phase even though the host responds immunologically. Chronic and degenerative pathologic changes also characterize lentiviral infections (Corredor et al., 2010).

The Jembrana disease virus (JDV), a bovine lentivirus, is the etiologic agent of the Jembrana disease which was first described in cattle on the Island of Bali in Indonesia in 1964. In contrast to BIV, which is associated with a chronic and mostly asymptomatic infection in its natural host (Carpenter et al., 1992; Snider et al., 2003), JDV leads to death in 15-17% of Bali cattle within 5 to 8 weeks post infection whereas the other animals recover and remain asymptomatic (Desport and Lewis, 2010). Consequently, in contrast to the chronic infection state associated with other lentiviruses like HIV type 1 (HIV-1) and BIV, JDV is unique in the sense that it may be considered as an acute infection-causing lentivirus. Despite its peculiar pathogenicity compared to other lentiviruses, JDV has been poorly studied, especially at the molecular level. This might be due to the fact that *in vitro* cell cultures have not been identified so far to allow JDV replication (Wilcox et al., 1992). Consequently, data available for JDV have been obtained from raw tissue materials of animals infected with the virus (Desport and Lewis, 2010; Desport et al., 2009; Tenaya et al., 2012).

JDV has the shortest genome (7.732 kb in length) of any lentiviruses (Desport and Lewis, 2010). JDV provirus DNA has a typical retroviral genome structure containing the gag, pol and env genes with the presence of long terminal repeats (LTRs) at the 5' and 3' termini. It also contains several regulatory/accessory genes that encode proteins, some of which are involved in the regulation of virus gene expression. Among the latter is the Rev (Regulator of viral expression) protein. JDV Rev is a 23-kDa (213 amino acids (aa)) phosphoprotein produced from a multiply spliced mRNA that contains two encoding exons located in the env gene (Stewart et al., 2008). The main function of lentiviral Rev protein is to mediate the nuclear exportation of partially spliced viral RNAs encoding structural proteins, and of unspliced viral RNAs that serve as genomic RNA. Rev exerts its function by interacting with a stem-loop structure termed Rev responsive element (RRE) located within these RNAs (Pollard and Malim, 1998). Lentiviral Rev protein contains at least three functional domains: i) a basic arginine-rich domain that mediates RNA binding (RBD) and contains the nuclear/nucleolar localization signals (NLS/NoLS) necessary for the protein transport from the cytoplasm to the nucleus and nucleolus; ii) a multimerization domain; and iii) a leucine-rich domain that contains a nuclear export signal (NES) necessary for Rev exportation from the nucleus to the cytoplasm (Fisher et al., 1995).

The nuclear import of lentiviral Rev proteins into the cell nucleus is mediated by the direct binding of their NLS to nuclear transport receptors such as importin β , transportin, importins 5 and 7, and importins α/β described in HIV-1 and BIV Rev, respectively (Henderson and Percipalle, 1997; Gomez Corredor and Archambault, 2012). Two types of classical NLSs recognized by importin α have been reported: monopartite and bipartite. The monopartite NLSs, which are composed of a single cluster of basic aa, are currently categorized into five classes on the basis of aa composition and of their interaction with importins (Kosugi et al., 2009). Bipartite NLSs are composed of two clusters of basic aa that are separated by a spacer region. They are classified into two types according to the length of the spacer region: the long type with a spacer of 30 to 32 aa, and the short type with a spacer of 8 to 16 aa (Romanelli and Morandi, 2002). The NLSs of HIV-1 and EIAV Rev are composed of a single cluster of basic residues but only the NLS of EIAV Rev has been proven

to be monopartite (Kubota et al., 1989; Lee et al., 2006), whereas that of BIV Rev is the only lentivirus Rev characterized so far that has a bipartite structure (Gomez Corredor and Archambault, 2009). In addition to NLSs, lentiviral Rev proteins contain a NoLS that mediates their accumulation in the cell nucleoli (Kubota et al., 1989; Gomez Corredor and Archambault, 2009). These NoLSs correspond to one or multiple copies of the R/K-R/K-X-R/K consensus motif (Horke et al., 2004) and have been reported in lentiviral Rev proteins to be either intrinsically associated with the NLS, as described in HIV-1 (Kubota et al., 1989), or present in the spacer sequence of a bipartite NLS, as reported in BIV (Gomez Corredor and Archambault, 2009).

To date, there has been no report on the localization of JDV Rev in cells and on the functional domains of the protein. In the present study, the subcellular distribution of JDV Rev fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) was thus examined and the NLS, NoLS and NES of the protein were identified. The JDV Rev protein was shown to predominantly localize to the cytoplasm and nucleolus. The JDV Rev was also shown to be exported from the nucleus via a CRM1 (Chromosomal Maintenance 1) protein pathway like HIV-1 and BIV Rev. By generating a series of deletion and site-specific mutants, a JDV Rev monopartite-like NLS was mapped. Moreover, and in contrast to other lentiviral Rev NoLS, the JDV Rev NoLS was found to be bipartite in structure. Finally, the NES of JDV Rev was found to be of the protein kinase A inhibitor (PKI) class like the BIV Rev NES. However, the NES of JDV Rev, in contrast to that of BIV Rev, corresponds to the most optimal consensus sequence of PKI NES.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Cell cultures and transfection

All cells used in this study were exempt of Mycoplasma, as determined by using the e-Myco™ VALiD Mycoplasma PCR detection kit (iNtRON Biotechnology, Burlington, MA). Bovine macrophages (BoMac) (Stabel and Stabel, 1995), Madin-Darby Bovine Kidney

(MDBK) epithelial cells (ATCC: CCL-22) (Kempster et al., 2002) and HEK293T cells (ATCC: CRL-3216) were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM for HEK293T), Eagle's minimum essential medium (EMEM for MDBK cells) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (for BoMac cells) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories Inc., Etobicoke, Ontario, Canada). For transfections, the cells were plated at a cell density of ~ 50% confluence in 24-well cell culture plates (used for the microscopy analyses) or in 6-well cell culture plates (used for the Rev activity assay). The next day, plasmids were mixed with Xtreme Gene 9 transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN) and added to the cells according to the manufacturer's protocol.

2.3.2. Plasmid constructs encoding the JDV Rev WT and deletion mutant proteins

The gene encoding the JDV Rev WT protein of the Tabanan/87 strain (GenBank accession number U21603.1) was kindly provided by Dr Moira Desport (Murdoch University, Perth, Australia) (Desport and Lewis, 2010). The gene was cloned into the pEGFP-C1 expression vector (Clontech, Palo Alto, CA) to generate a plasmid construct (pEGFP-JDV Rev WT) able to produce EGFP fused to the JDV Rev WT protein (EGFP-JDV Rev WT). Ten JDV Rev mutant (JM) proteins containing internal deletions of 32 (for JM1) or 20 (for JM2 to JM10) aa were generated from the pEGFP-JDV Rev WT construct by PCR-ligation-PCR mutagenesis (Ali and Steinkasserer, 1995). Briefly, upstream and downstream blunt-ended cDNA fragments were amplified from the pEGFP-JDV Rev WT plasmid construct with appropriate phosphorylated primers (sequences available upon request). Fragments were purified and ligated to the corresponding upstream fragment. Ligation products were amplified by using the forward Rev5' (5'- TCCGAATTCTATGATGGAAGAAGG -3') and reverse Rev3' (5'- GCAAGGGCCCACTGGGCG-TATTCC -3') primers that introduced EcoRI and ApaI restriction sites (underlined nucleic acids), respectively. The generated PCR products were then digested with EcoRI and ApaI and cloned back into the pEGFP-C1 expression vector. The N-terminal (JM1) and C-terminal (JM10) mutant sequences were amplified using

a forward primer containing an ATG initiation codon and a reverse primer containing a stop codon, respectively.

To generate the pEGFP-NLS JDV construct, the nucleic acids encoding aa 74 to 105 of the JDV Rev WT protein and associated with a putative NLS was amplified by PCR and cloned into the pEGFP-C1 vector as described above. Where indicated, alanine substitution mutants were introduced into the EGFP-JDV Rev WT protein by PCR site-directed mutagenesis using appropriate primers. To generate EGFP-GST and EGFP-GST-NLS, the GST-encoding sequence from pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada) was amplified with appropriate primers and cloned into pEGFP-C1 and pEGFP-NLS JDV, respectively, using the Gibson assembly mastermix (New England Biolabs, Ipswich, MA). The EGFP- β Gal and EGFP- β Gal-NLS constructs were similarly generated using the β Gal-encoding sequence derived from pSV- β Gal (Clontech). All constructs were validated by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montréal, Québec, Canada).

2.3.3. Fluorescence microscopy

Cells cultured on coverslips in 24-well cell culture plates were transfected with pEGFP-JDV Rev WT or each of the pEGFP-JDV Rev mutants. After an incubation of 24 h and, where indicated, 5 nM of leptomycin B (LMB), a known nuclear exit inhibitor (Kudo et al., 1998), was added to the cell culture medium for 5 h. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3) solution for 15 min. For the immunofluorescence assay, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 4% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C, and then incubated with rabbit polyclonal IgG primary anti-C23 (nucleolin) antibodies (H-250) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS containing 0.2% Triton X-100, the cells were incubated with Alexa 647-labeled anti-rabbit secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnologies) for 1 h at 37°C. Coverslips were mounted onto glass slides using ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were imaged by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Nikon A1 confocal

system, equipped with a 60× oil immersion objective. The NIH ImageJ 1.62 public domain software was used to determine the cytoplasmic (Fc), nuclear (Fn) and nucleolar fluorescence (Fno) values. These values were then utilized to determine the nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio (Fn/c) by using the equation: $Fn/c = (Fn - Fb)/(Fc - Fb)$, where Fb refers to the background fluorescence (McLinton et al., 2017). The same equation path was used to determine the nucleolar/nuclear fluorescence ratio (Fno/n). The data shown are representative of the expression patterns observed in 30 cells from three independent experiments (10 analyzed cells per experiment).

2.3.4. CAT assay

The JDV Rev nuclear export activity was quantified in transient-transfection assays using a pDM138-based BIV Rev chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter construct containing the BIV RRE (pRRE-BIV) (Gomez Corredor and Archambault, 2009). HEK293T cells were seeded in 6-well cell culture plates and cotransfected with 0.5 µg of empty pEGFP-C1 or each of the pEGFP constructs encoding either the JDV Rev WT protein or each of the JDV Rev mutant proteins, and 0.5 µg of pRRE-BIV. Cells were harvested at 48 h after transfection and lysed with the lysis buffer [provided in the CAT enzyme-linked immunosorbent assay kit (CAT-ELISA kit; Roche, Penzberg, Germany)]. The amount of CAT in 50 µg of total cellular proteins was assessed using the CAT-ELISA kit. The CAT-ELISA data were normalized to the level of EGFP-JDV Rev protein expression as determined by Western blot (Li et al., 2004). The mean Rev activity value (obtained from three independent experiments, triplicate samples per experiment) of the JDV Rev WT and each of the JDV Rev mutant proteins was expressed as the mean ratio of respective EGFP-JDV Rev protein CAT expression to the basal expression of pRRE-BIV in presence of EGFP alone.

The pDM128 plasmid construct containing the HIV-1 RRE (pRRE-HIV) (Bogerd et al., 1998) was used in the CAT-ELISA to determine the activity of HIV-1 Rev and of all mutant proteins tested in the Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay (see below). To this end, HEK293T cells were cotransfected with 0.5 µg of either empty pEGFP-C1, Rev(1.4)-NES3-

EGFP or each of the Rev(1.4)-JDVNES-EGFP mutant constructs (see below) and 0.5 µg of pRRE-HIV. The HIV-1 Rev activity (obtained from three independent experiments, triplicate samples per experiment) was expressed as the mean ratio of Rev1.4-NES3-EGFP or mutant protein CAT expression to the basal expression of pRRE-HIV in presence of EGFP alone.

2.3.5. SDS-PAGE and Western Blot analysis

For each sample, a total cell extract quantity of 50 µg was separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in PBS-Tween 0.05% (PBS-T) containing 5% of nonfat dry milk for 1 h at room temperature prior to the addition of mouse monoclonal primary antibodies specific to EGFP for 1 h (Santa Cruz Biotechnologies, B-2 clone). The membranes were then washed three times with PBS-T and incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgGs (Thermo Fisher, Waltham, MA) diluted in PBS-T and 5% nonfat dry milk. The signal was detected by enhanced chemiluminescence with a Fusion FX7 apparatus (Vilber, Collégien, France). The bands were then analyzed with the ImageJ software to determine the EGFP-Rev expression level for CAT-ELISA data normalization.

2.3.6. Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay

To determine the aa important for Rev exportation, the Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay was used (Henderson and Eleftheriou, 2000). This assay is based on the ability of a predicted NES sequence to promote the nuclear export of the HIV-1 NES-deficient Rev(1.4)-EGFP fusion protein. The NES-deficient Rev(1.4)-EGFP and Rev(1.4)-NES3-EGFP (a construct that contains the intact HIV-1 Rev NES sequence) plasmids were kindly provided by Dr Beric Henderson (University of Sydney, Sydney, Australia) (Bogerd et al., 1998). Alanine substitution NES mutant sequences were derived from the predicted JDV Rev NES sequence by using complementary synthetic oligonucleotides that were ligated into the compatible ends

of BamHI- and AgeI-digested Rev(1.4)-EGFP plasmid. All mutant constructs were validated by sequencing.

To conduct the Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay, HEK293T cells were cultured on coverslips in 6-well cell culture plates. The cells (50% confluence) were then transfected with Rev(1.4)-EGFP (negative control), Rev(1.4)-NES3-EGFP (positive control), or plasmids containing the NES sequence of JDV Rev WT or each of the JDV Rev NES mutated sequences. After an incubation time of 24 h, transfected cells were left untreated or exposed to both cycloheximide (10 µg/ml) and actinomycin D (ActD) (5 µg/ml) for 3 h or to LMB (5 nM) for 1 h prior to the cycloheximide and ActD (cycloheximide/ActD) treatment. Cycloheximide is a protein synthesis inhibitor that was used to ensure that any cytoplasmic green fluorescence resulted from the nuclear export of EGFP fusion protein rather than novel synthesis of the protein. ActD was used to promote the re-localization of HIV-1 Rev in the cytoplasm (Henderson and Eleftheriou, 2000). At the end of the incubation period the cells were fixed, counterstained with DAPI, and the coverslips were mounted on glass slides using ProLong gold antifade reagent. Cells were imaged by CLSM and analyzed as described above. The data shown are representative of the expression pattern observed in 30 cells from three independent experiments (10 analyzed cells per experiment).

2.3.7. Statistics

All the experimental results were expressed as mean values + the standard error about the mean (SEM). Statistical analysis was performed by using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA). Unless otherwise specified, data were analyzed using either a Student's T-test to compare data from two group means or, where applicable, corrected with the Holm-Sidak method for multiple comparison of the means, a one-way ANOVA followed by a post-hoc Dunnett's test (ANOVA Dunnett's test) to compare the mean of each of the JDV Rev mutants to that of the JDV Rev WT protein, or a one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's multiple-comparison test (ANOVA Tukey's multiple-comparison test) to compare the means of the JDV Rev mutant proteins to each other's.

2.4. Results

The JDV Rev protein fused to EGFP mainly localizes to the cytoplasm and nucleolus. To determine the intracellular localization of the JDV Rev protein, bovine cell lines (MDBK and BoMac) were transfected with pEGFP-JDV Rev WT, encoding the JDV Rev WT protein fused to EGFP. In MDBK and BoMac transfected cells, the EGFP-JDV WT Rev protein predominantly localized to the cytoplasm of bovine cells without LMB treatment (Fig. 2.1A and B) with a slight nucleolar localization (Fig. 2.1A and C), as expected for a lentiviral Rev protein (Kubota et al., 1989; Gomez Corredor and Archambault, 2009). Moreover, the Rev protein colocalized with nucleolin used as a nucleolar marker (Fig. 2.1A). No significant differences were observed between the Fn/c and Fno/n ratios measured for the MDBK and BoMac cells. Considering that transfection of MDBK cells resulted in a higher number of cells expressing EGFP-JDV Rev WT, subsequent experiments were conducted using these cells.

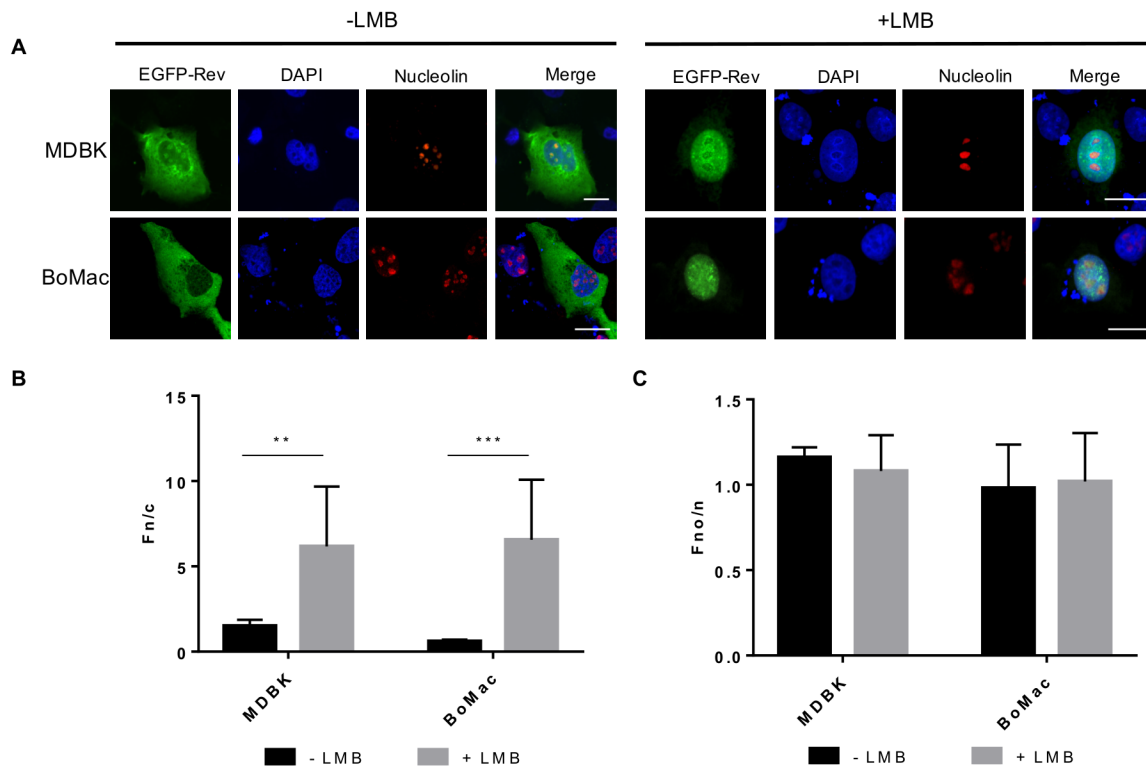


Figure 2.1. Subcellular localization of the JDV Rev WT protein fused to EGFP.

(A) Microscopy analysis of EGFP-JDV Rev WT protein (in green) expressed in MDBK and BoMac cells following transfection for 24 h with pEGFP-JDV Rev WT. Cells were left untreated or treated with 5 nM of leptomycin B (LMB) for 5 h and then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). The merge panel represents the superposition of EGFP-JDV Rev, DAPI, and nucleolin images. The images shown are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The white bars correspond to a length of 10 μm . Images were derived by using CLSM at 60x magnification and analyzed to determine the Fn/c (B) and the Fno/n (C) ratios. Results are expressed as the mean Fn/c or Fno/n ratio \pm SEM ($n = 30$). For each cell line, significant differences, using a Student's T-test corrected with the Holm-Sidak method for multiple comparison of the means, with and without LMB treatment, are indicated by ** ($P < 0.005$) and *** ($P < 0.0005$). No significant differences, using an ANOVA Tuckey's multiple-comparison test, were observed between the Fn/c and Fno/n ratios measured for the MDBK and BoMac cells, regardless of the LMB treatment.

The export of the JDV Rev protein from the nucleus to the cytoplasm involves the CRM1 protein pathway. All Rev and Rev-like proteins characterized so far interact with the CRM1 protein, allowing them to be exported from the nucleus to the cytoplasm (Askjaer et al., 1998; Otero et al., 1998; Hakata et al., 2003; Mayer et al., 2004; Indik et al., 2005). To determine whether the JDV Rev WT export is dependent on the CRM1 protein pathway, the BoMac and MDBK cells were transfected each with pEGFP-JDV Rev WT for 24 h and then treated for 5 h with LMB, a well-known inhibitor of CRM1. As shown in Fig. 2.1A and B, the JDV Rev WT protein accumulated exclusively in the nucleus of bovine cells in presence of LMB, indicating that the JDV Rev WT nucleocytoplasmic export is CRM1-dependent. These results obtained with these cells also indicated that the cellular distribution of JDV Rev WT was not a cell-line specific effect.

It is noteworthy that the Fno/n ratios obtained for all LMB-treated bovine cells were not significantly different from those of LMB-untreated cells even though the Rev protein accumulated in the nucleus. These results were attributed to the assumption that nucleus accumulation of Rev more likely lead to more proteins in the nucleolus such as the Fno/n ratios were kept similar in presence or absence of LMB (Fig. 2.1C).

Subcellular localization of the JDV Rev deletion mutant proteins. In order to identify the region necessary for nuclear and nucleolar localization, plasmids encoding for a series of JDV Rev deletion mutants fused to EGFP were generated (Fig. 2.2A), and the subcellular distribution of the proteins was analyzed by fluorescence microscopy in presence or absence of LMB. The results showed that seven of the ten Rev mutants (JM1, JM2, JM3, JM7, JM8, JM9 and JM10) showed a subcellular distribution similar to that of the JDV Rev WT protein with a cytoplasmic and nucleolar localization without LMB treatment, and a predominant nuclear localization in presence of LMB (Fig. 2.S1). The JM1 mutant localized to the cytoplasm as the mutants described above in absence of LMB. However, it also showed a prominent nuclear localization as compared to the JDV REV WT protein in absence of LMB treatment (Fig. 2.2C, Fig. 2.S1). This observation was attributed to the deletion in that mutant of the R-D-L-L-Q-R-A-V sequence that is similar to the E-D-L-L-R-A-V motif present in the HIV-1 Rev first multimerization domain (Hoffmann et al., 2012). Indeed, preliminary data obtained in our laboratory identified the deleted sequence in JM1 to be associated with the multimerization domain of the JDV Rev WT protein. Considering that a lentivirus Rev protein must at least dimerize to interact with CRM1, thereby allowing its export from the nucleus to the cytoplasm, the deleted sequence in JM1 would have led to a reduced export and, thereof, nuclear accumulation of the mutant protein (Hoffmann et al., 2012). In contrast, the JM4 mutant showed a strong cytoplasmic signal with a minor nuclear localization in presence of LMB (Fig. 2.2B and C). This result indicated that the deleted sequence in mutant JM4 contains aa associated with NLS function. In addition, mutant JM4 showed a weak nucleolar signal, thereby indicating that the sequence deleted in this mutant also has an impact on the nucleolar localization of JDV Rev (Fig. 2.2B and C). The JM5 mutant localized to the cytoplasm and nucleus of transfected cells but poorly in the nucleoli in absence of LMB (Fig. 2.2B). This result suggested that the sequence deleted in mutant JM5 contains aa associated with NoLS function. Finally, the JM6 mutant only accumulated in the nucleus of transfected cells regardless of the LMB treatment (Fig. 2.2B and D). This indicated that the sequence deleted in mutant JM6 more likely contains a NES. Also, for all proteins but JM6, the

difference between the Fn/c ratios without LMB and with LMB was significant according to a Student's T-test corrected with the Holm-Sidak method for multiple comparison of the means.

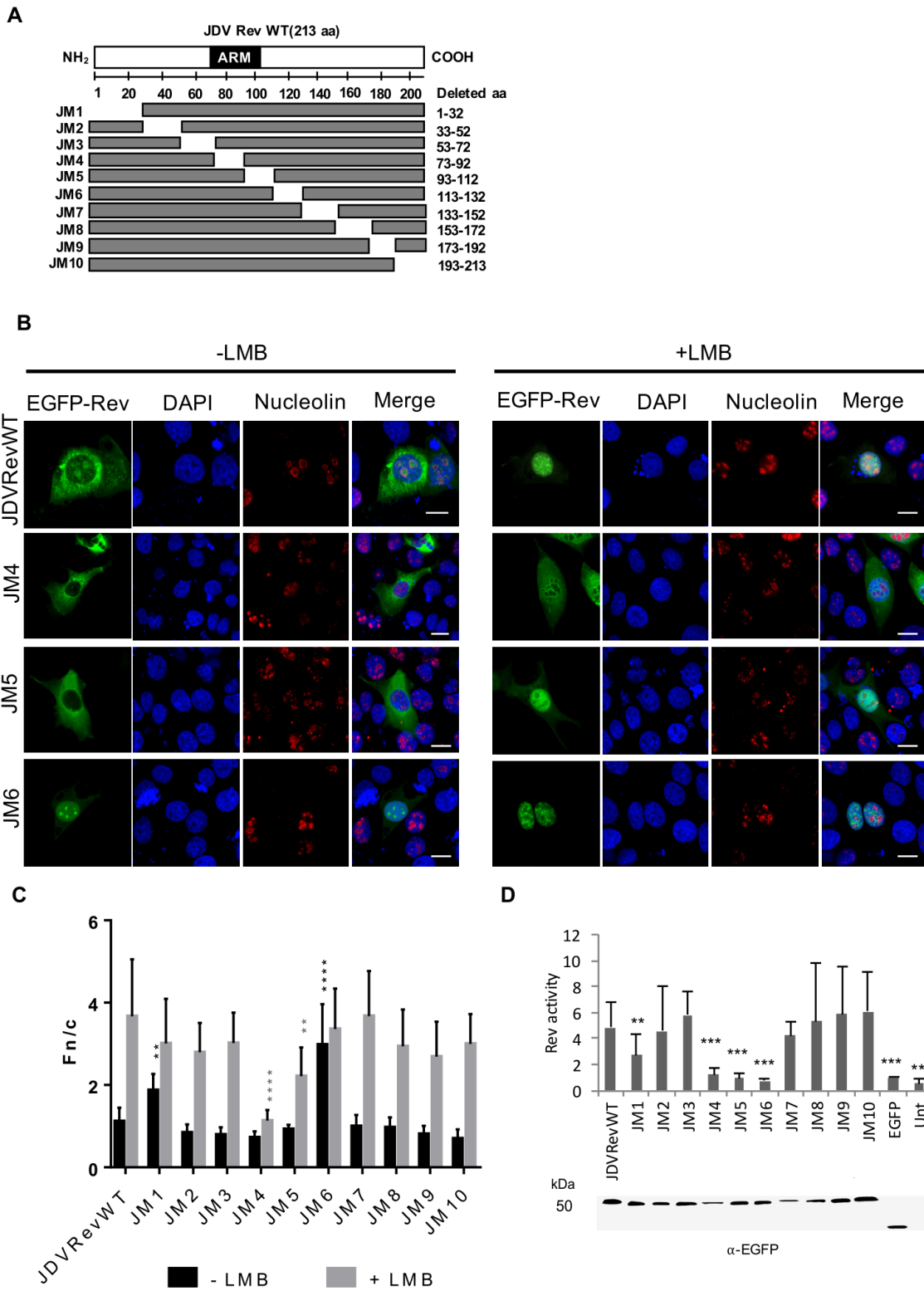


Figure 2.2. Subcellular localization of the JDV Rev deletion mutant proteins fused to EGFP.

(A) JDV Rev mutant-encoding sequences were generated from the JDV Rev WT gene by PCR-ligation-PCR and then cloned into pEGFP-C1 for expression of the JDV Rev mutant (JM) proteins fused to EGFP. ARM: arginine-rich motif. (B) Microscopic analysis of the JM4 to JM6 mutant proteins (in green) expressed in MDBK cells at 24 h post transfection. Cells were fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP-JDV Rev, DAPI, and nucleolin images. The white bars correspond to a length of 10 μ m. CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios (C) without or with LMB treatment. Results expressed as the mean Fn/c ratio \pm SEM (n = 30) are shown for the JDV Rev WT protein and each of the JDV Rev deletion mutants. Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the deletion mutant proteins (JM1 to JM10) are indicated by ** (P < 0.005). **** (P < 0.00005). (D) The nuclear export activity of EGFP-JDV Rev WT or EGFP-Rev deletion mutant proteins (JM1 to JM10) was determined using a CAT reporter assay. The CAT expression levels were normalized to EGFP-Rev expression for each protein in cell lysates as determined by Western blot using an EGFP-specific antibody (bottom of the panel). Rev activity was then determined as the ratio of EGFP-JDV Rev WT or mutant protein CAT expression to the basal expression from pDM128 or pDM138 constructs co-transfected with empty pEGFP-C1 only. The mean Rev activity values \pm SEM were obtained from three independent experiments (triplicate samples per experiment). Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the deletion mutant proteins are indicated by ** (P < 0.005), and *** (P < 0.0005). Unt: untransfected cells.

After determining the subcellular localization of JDV Rev WT and each of the Rev mutant proteins, the impact of the mutations on their nuclear export activity was examined by conducting a RNA export assay using the pRRE-BIV CAT reporter construct. This vector contains the CAT gene and the BIV RRE derived from the env gene (Gomez Corredor and Archambault, 2009; Molina et al., 2002) within an intron flanked by HIV-1 splice sites (Huang et al., 1991). Unspliced transcripts from the pRRE-BIV CAT construct are exported to the cytoplasm only if functional Rev is present, resulting in a significant CAT activity. In absence of functional Rev, only background CAT activity can be detected. As the JDV RRE sequence was still not characterized at the time of this study, a preliminary experiment was conducted to assess the nuclear export activity of JDV Rev using heterologous BIV and HIV-1 RRE (Bogerd et al., 1998). Since a significant result was only obtained by using the BIV RRE sequence (Fig. 2.S2), all further JDV Rev activity assays were conducted using pRRE-BIV CAT construct. As shown in Fig. 2.2D, mutants JM1, JM4, JM5, and JM6 displayed an export

activity that was significantly lower than that of the JDV Rev WT protein. The results obtained with mutants JM4 and JM6 are consistent with, as mentioned above, the absence of NLS or NES in these mutants, respectively. The low CAT activity level obtained for mutant JM5 may be attributed to residues deleted in this sequence that might be part of the NLS or, alternatively, of the RNA binding domain (RBD) necessary to interact with the RRE. Altogether, these results suggest that the sequence deleted in mutants JM4 and JM5 contains residues important for the nuclear and/or nucleolar localization of the JDV Rev protein. Finally, the decrease in Rev activity for mutant JM1 was attributed to the loss of a multimerization domain-associated NIS-like sequence the counterpart of which, in HIV-1, has been reported to have a negative impact on the virus replication (Hoffmann et al., 2012). In any case, the region deleted in mutant JM1 does not contain a NLS, as the protein readily localized to the nucleus.

The sequence encompassing amino acids 74 to 105 of the JDV Rev protein directs the nuclear/nucleolar localization of chimeric proteins. The trafficking of molecules from the cytoplasm to the nucleus and nucleolus is mediated by NLS and NoLS, respectively. These signals are usually composed of basic aa like arginines and lysines (Dingwall and Laskey, 1991; Emmott et al., 2008; Lange et al., 2007). Consequently, the basic aa contained in the deleted sequences of mutants JM4 and JM5 could be associated with NLS and/or NoLS functions. To examine this, the sequence composed of aa 74 to 105 and rich in arginine residues was fused to the C terminus of EGFP (Fig. 2.3A). Expectedly, EGFP (~27 kDa) alone showed diffuse distribution in the cytoplasm and nucleus/nucleolus of transfected cells (Fig. 2.3B). In contrast, the EGFP 74-105REV chimeric protein accumulated in the nucleus and in the nucleolus and was totally absent from the cytoplasm. To confirm that the nuclear localization was attributed to the presence of a functional NLS and not to the diffusion followed by retention of the protein in the nucleus due to a nuclear retention signal, a cytoplasmic protein of larger size, namely EGFP- β Gal (~143 kDa as a monomer and ~560 kDa in the tetrameric active form of β Gal) fused to the JDV NLS sequence, was used. EGFP- β Gal localized almost exclusively to the cytoplasm. In contrast, EGFP- β Gal-NLS JDV protein localized mainly in the nucleus/nucleolus of transfected cells (Fig. 2.3A and B). Essentially

identical results were obtained when the JDV NLS was fused to a protein of lesser size (EGFP-GST, ~60 kDa). Altogether the results unequivocally indicated that the sequence encompassing aa 74 to 105 of the JDV Rev WT protein contains functional NLS/NoLS that can direct cytoplasmic proteins, in this case EGFP, EGFP-βGal and EGFP-GST, to the cell nucleus and nucleolus.

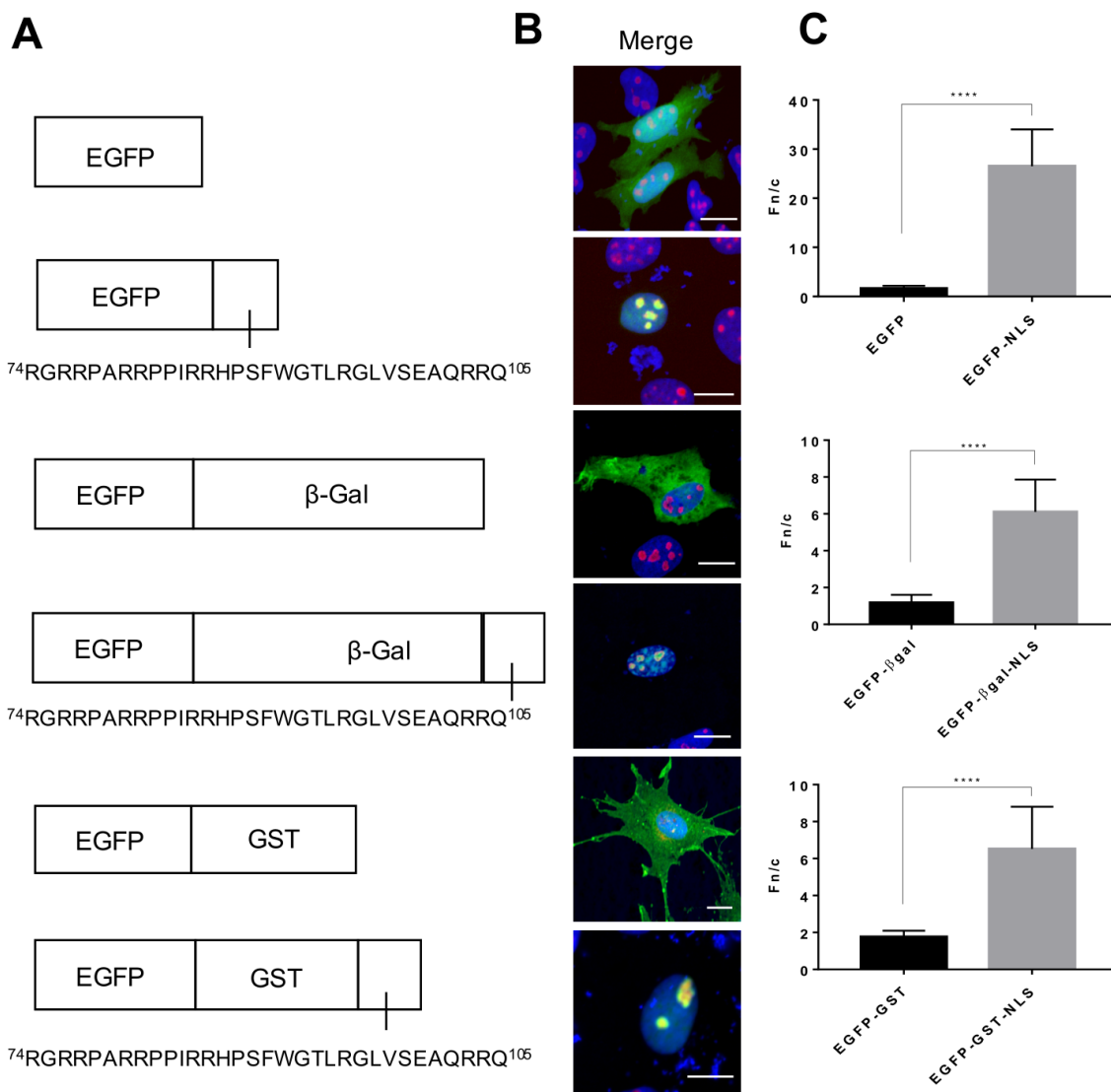


Figure 2.3. The region encompassing amino acids (aa) 74 to 105 of the JDV Rev protein is associated with NLS/NoLS functions.

(A) The 74 to 105 aa sequence containing basic residues present in deleted sequences of JDV Rev mutants JM4 and JM5 was inserted into pEGFP-C1, pEGFP-βGal or pEGFP-GST vectors. (B) MDBK cells were transfected with plasmid vectors encoding either the EGFP,

EGFP- β Gal or EGFP-GST proteins alone or fused to the JDV 74-105REV sequence described in panel A. After an incubation time of 24 h, the cells were fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Expression of the proteins was detected via the EGFP fluorescence (in green). Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. The white bars correspond to a length of 10 μ m. (C) CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios. Results (mean Fn/c ratio \pm SEM, for n = 30) are shown for the different EGFP proteins. Significant differences, using a Student's T-test, between EGFP, EGFP-GST or EGFP- β Gal and each of the protein counterparts fused to the JDV 74-105REV sequence, are indicated by ****(P < 0.00005).

The NLS motif in the JDV Rev protein is monopartite-like. To identify which aa are necessary for the NLS function of JDV Rev, a series of mutants (Mut1 to Mut17) were generated by site-directed mutagenesis in which arginine (R) residues located in the 74-105 aa sequence described above, were successively substituted with alanine (A) residues (Fig. 2.4A). Single alanine substitutions at residues 74 (Mut1), 81 (Mut5), 86 (Mut7), or 95 (Mut17) had no impact on the cell distribution of the mutant proteins as they showed, as for the JDV Rev WT protein, a predominant nuclear localization in presence of LMB (Fig. 2.4B, Fig. 2.S3). In contrast, alanine substitutions at residues 76 (Mut2), 77 (Mut3), 80 (Mut4), and 85 (Mut6) had a negative effect on the localization of these mutant proteins in presence of LMB as they were cytoplasmic and nuclear (Fig. 2.4C and 2.S3). Double alanine substitutions at residues 76-77 (Mut8), 80-81 (Mut9) and 85-86 (Mut10), and combined alanine substitutions (Mut11 to Mut15) targeting a series of arginine residues from aa 74 to 86 also had a somewhat more negative effect on the nuclear localization of these mutant proteins in presence of LMB as determined by their low Fn/c ratios (Fig. 2.4B and C). Finally, mutant Mut16 with double alanine substitutions at residues 103 and 104 showed a cell distribution phenotype similar to that of the JDV Rev WT protein with a strong nuclear localization in presence of LMB, indicating that these residues are not associated with NLS function. It is noteworthy, however, that this mutant protein did not localize to the cell nucleolus regardless of the LMB treatment (Fig. 2.S3), suggesting that the 103 and 104 arginine residues are associated with NoLS function. Combined, the results obtained from the JDV Rev alanine substitution mutants are indicative of the presence of a monopartite-like NLS in JDV Rev that is composed of residues 76RRPARRPPIRR86. However, as a so-called monopartite NLS is defined as a classical NLS

(Kosugi et al., 2009; Romanelli and Morandi, 2002), importin β -binding experiments (Gomez Corredor and Archambault, 2012) are needed to unequivocally confirm the monopartite nature of JDV Rev NLS. Therefore, the monopartite-like NLS designation was used herein.

A

	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Rev WT	R	G	R	R	P	A	R	R	P	P	I	R	R	H	P	S	F	W	G	T	L	R	G	L	V	S	E	A	Q	R	R
Mut1	A																														
Mut2			A																												
Mut3				A																											
Mut4							A																								
Mut5								A																							
Mut6												A																			
Mut7													A												A						
Mut8			A	A																											
Mut9							A	A																							
Mut10												A	A																		
Mut11	A		A	A								A	A																		
Mut12			A	A			A	A				A	A																		
Mut13	A		A	A			A	A				A	A																		
Mut14	A		A	A			A	A				A	A																		
Mut15	A		A	A			A	A				A	A																	A	A
Mut16																													A	A	
Mut17																							A								

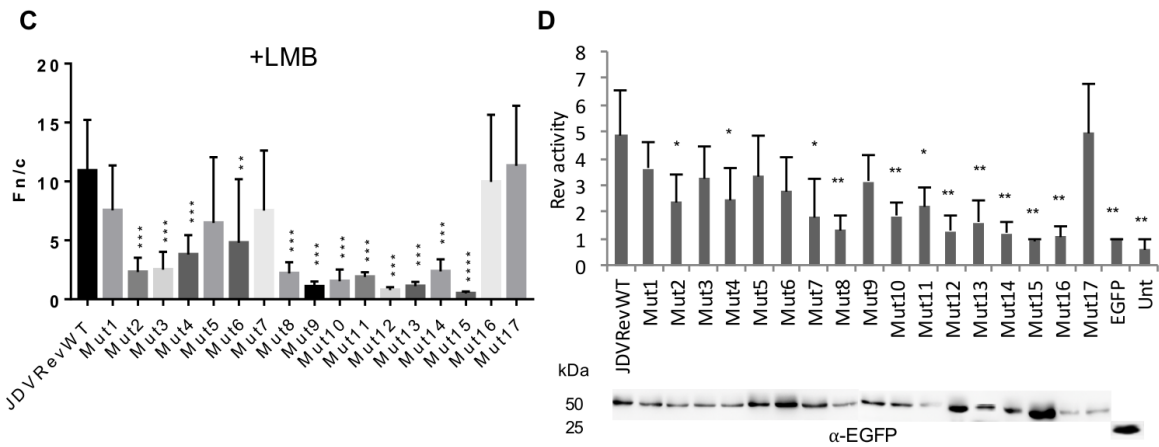
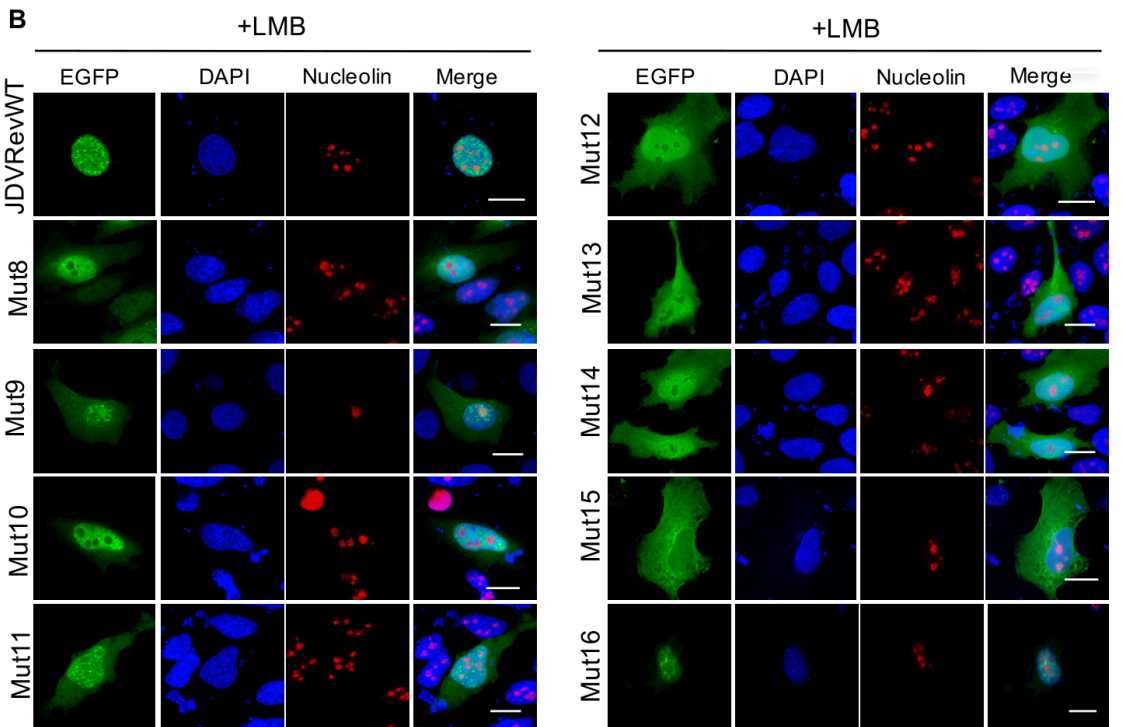


Figure 2.4. The NLS of the JDV Rev protein is monopartite-like.

(A) JDV Rev arginine (R) to alanine (A) substitution mutant proteins (Mut1 to M17) were generated from pEGFP-JDV Rev WT. (B) Subcellular localization of JDV Rev WT and mutant proteins harboring multiple arginine to alanine substitutions (Mut8 to Mut16) described in panel A. MDBK cells were transfected with pEGFP-JDV Rev WT or each of the mutant constructs, and incubated for 24 h. Cells were treated with leptomycin B (LMB) for 5 h or left untreated. Cells were then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. The white bars correspond to a length of 10 μ m. (C) CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios. Results (mean Fn/c ratio \pm SEM, for n = 30) are shown for the JDV Rev WT protein and each of the alanine substitution mutants. Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the substitution mutant proteins with LMB treatment are indicated by ** (P < 0.005), *** (P < 0.0005), and **** (P < 0.00005). (D) Nuclear export activity of the EGFP-JDV Rev WT and mutant proteins (Mut1 to Mut17) was determined using a CAT reporter assay. The CAT levels were normalized to the expression level of EGFP-JDV Rev WT or mutant proteins as determined by Western blot using an EGFP-specific antibody (bottom of the panel). Rev activity was then determined as the ratio of EGFP-JDV Rev WT or mutant protein CAT expression to the basal expression from pDM128 or pDM138 constructs co-transfected with empty pEGFP-C1 only. The mean Rev activity values \pm SEM were obtained from three independent experiments (triplicate samples per experiment). Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the substitution mutant proteins are indicated by * (P < 0.05) and ** (P < 0.005). Unt: untransfected cells.

As for the JDV Rev deletion mutants, the impact of the mutations on the nuclear export activity of mutants Mut1 to Mut17 was assessed using the RNA export CAT assay described above. As shown in Fig. 2.4D, mutants Mut2, 4, 7, 8, and 10 to 16 showed a significant decrease in their export activity when compared to that of the JDV Rev WT protein. These results correlated with the distinct cell distribution of all these mutants but Mut2, Mut4 and Mut7 when compared to that of the JDV Rev WT protein (Fig. 2.4C). Mutant Mut16 that was able to enter the nucleus but not the nucleolus, regardless of the LMB treatment, also displayed a significant decrease in nuclear export activity when compared to that of JDV Rev WT (P < 0.005). Finally, mutant Mut17 had a nuclear export activity similar to that of the JDV Rev WT protein.

The NoLS of the JDV Rev protein is bipartite in structure. To identify the aa important for the nucleolar localization of the JDV Rev WT protein, the mutants described above (Mut1 to Mut17) were used to transfect the MDBK cells in absence or presence of LMB. As shown in Fig. 2.S4, the Fno/n ratios of all mutant proteins but Mut17 were significantly lower than that of the JDV Rev WT protein, suggesting that the arginine residues substituted in these mutant proteins are important for the nucleolar localization of JDV Rev. Assuming that mutations affecting in the first place the nuclear import of a given protein will also influence its nucleolar localization, we wished to address the above JDV Rev NoLS composition assumption by an independent means. Thus the 74-86, 74-105 and 102-105 aa sequences of the JDV Rev WT protein, described in Fig. 2.5A, were fused successively to EGFP, a protein that can reach the nucleus by passive diffusion. As found in Fig. 2.5B and C, the 74-86 cluster of arginine residues was sufficient to localize EGFP to both the nucleus and nucleolus. In contrast, the 102-105 arginine residue cluster had no effect on EGFP localization. However, as shown in Fig. 2.5C, the complete 74-105 sequence showed stronger nuclear and nucleolar accumulation of EGFP than the 74-86 sequence indicating that both arginine clusters (74-86 and 102-105) indeed are important for optimal NoLS function. Based on these results and on the fact that mutant Mut16 of the JDV Rev protein, as mentioned above, was excluded from the nucleolus (Fig. 2.4), we concluded that the NoLS of JDV Rev is bipartite in structure, being composed of arginine residues present in the ⁷⁴RGRRPARRPPIRR⁸⁶ and ¹⁰²QRRQ¹⁰⁵ aa sequences.

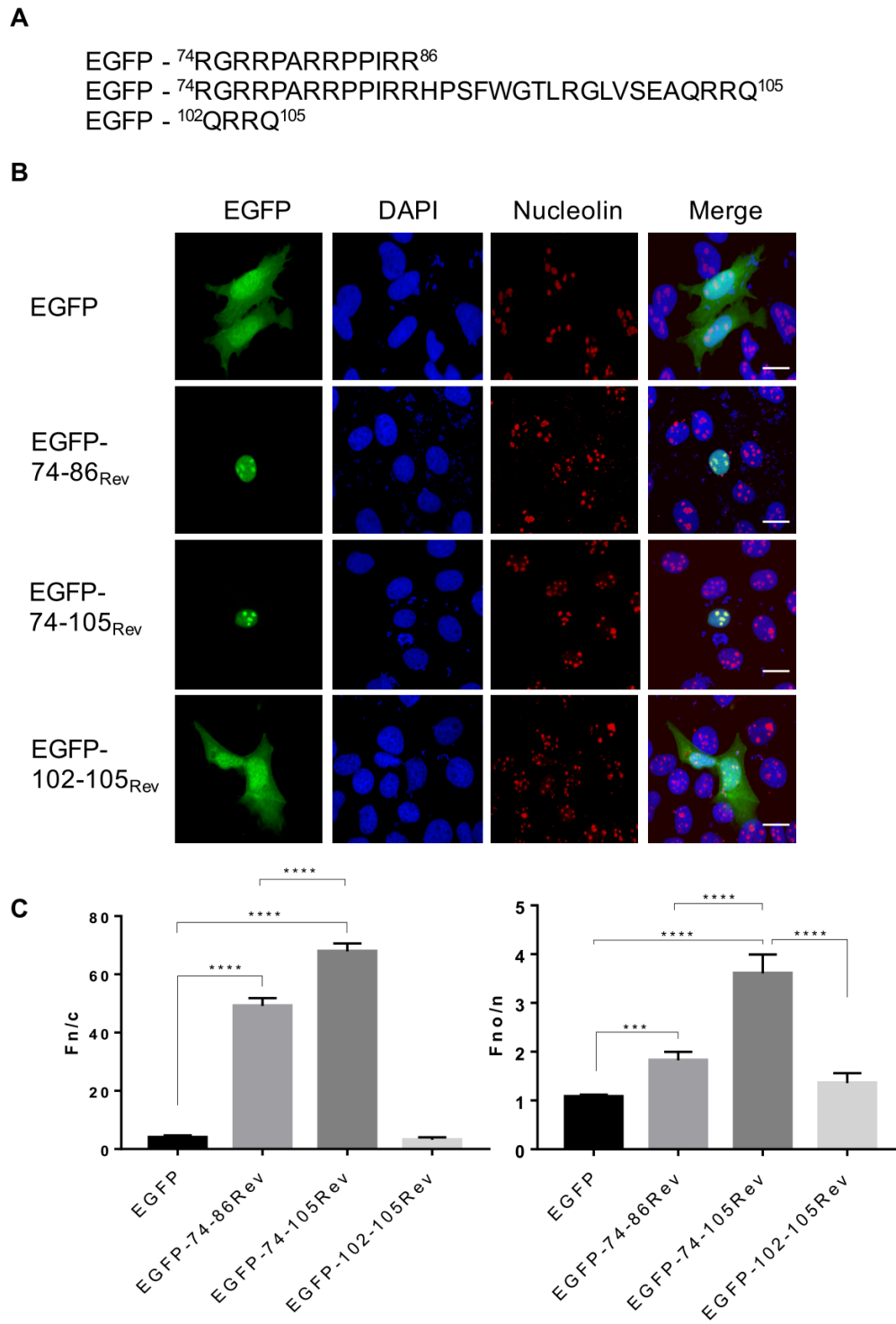


Figure 2.5. Subcellular localization of EGFP fused to JDV Rev arginine residue cluster sequences.

(A) MDBK cells were transfected with plasmid constructs encoding either EGFP or EGFP fused, at its C-terminal, to each of the JDV Rev arginine cluster sequences shown in the figure. (B) After an incubation of 24 h the cells were fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. The white bars correspond to a length of 10 μm . (C) The CLSM images were analyzed to determine the Fn/c and Fno/n ratios. Results were expressed as the mean Fn/c or Fno/n ratio \pm SEM (n = 30). Significant differences between the EGFP proteins, using an ANOVA Tukey's multiple-comparison test, are indicated by *** (P < 0.0005) and **** (P < 0.00005).

The NES of the JDV Rev protein. The canonical NES is generally composed of a short leucine-rich region, although other hydrophobic aa like methionine, phenylalanine and valine have also been identified in NES sequences (Güttler et al., 2010; Fung et al., 2017). As shown in Fig. 2.2B, the JDV Rev JM6 mutant protein accumulated in the nucleus of transfected cells regardless of the LMB treatment. Moreover, it was unable to export RNA from the nucleus to the cytoplasm in contrast to the JDV Rev WT protein as shown in the Rev activity assay (Fig. 2.2E). Accordingly, it was hypothesized that the region spanning from aa 113 to 132 likely contains a NES. This postulate was supported by using the NetNES 1.1 prediction program (La Cour et al., 2004), which identified a putative NES CRM1-dependent signal from aa 116 to 129 in the JDV Rev WT protein sequence.

In order to identify residues important for the export of JDV Rev from the nucleus to the cytoplasm, the HIV-1 Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay was used (Bogerd et al., 1998). In this assay, the NES is evaluated by analyzing its capacity to promote nuclear export of the HIV-1 Rev(1.4)-EGFP fusion protein deficient in NES function. Inserting a functional NES sequence in the pRev(1.4)-EGFP vector between the HIV-1 Rev(1.4) and EGFP sequences (as indicated in Fig. 2.6A) restores the nucleocytoplasmic shuttling activity of the fusion protein.

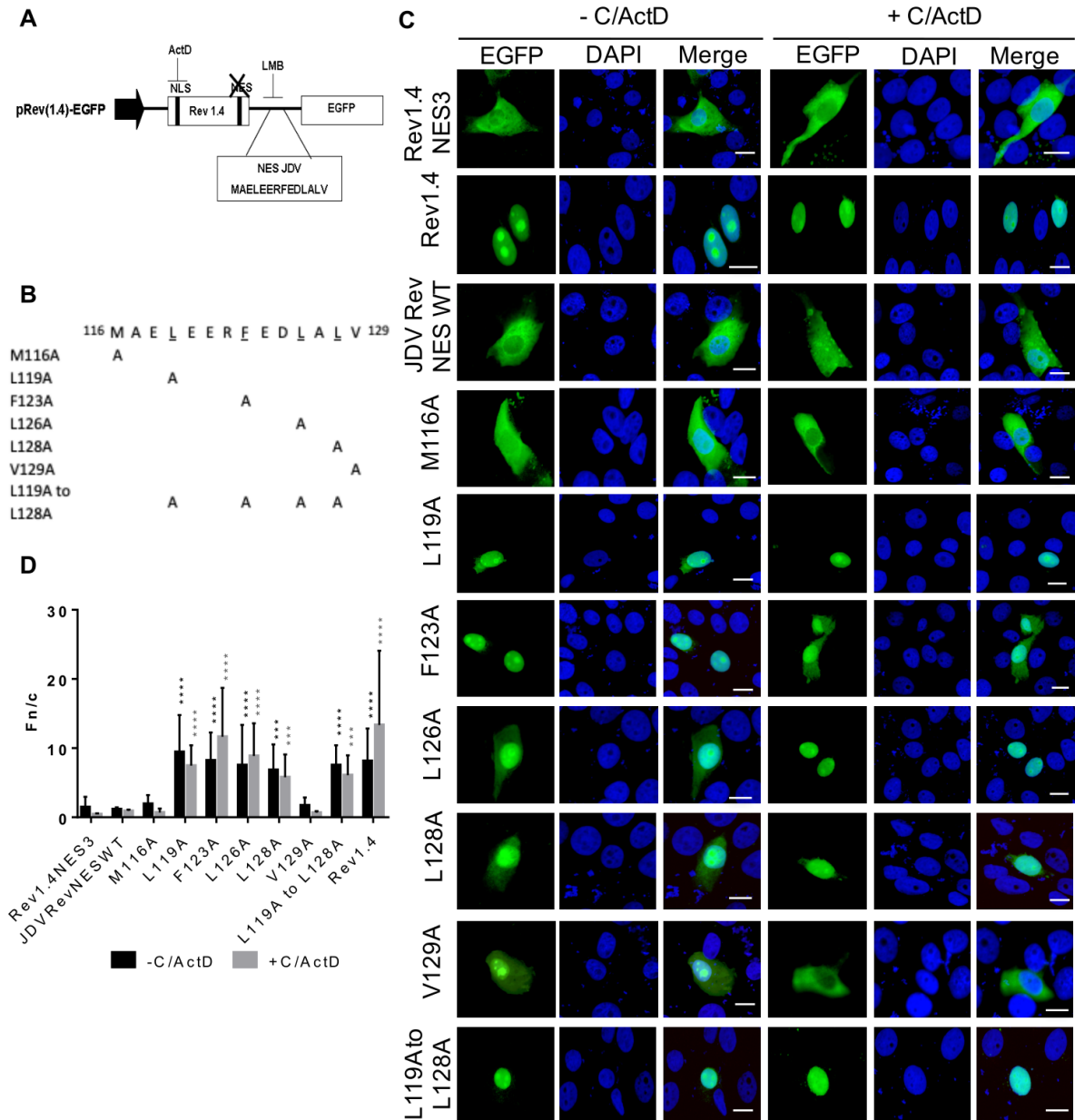


Figure 2.6. The JDV Rev protein contains a nuclear export signal (NES).

(A) Plasmids encoding HIV-1 Rev(1.4)-EGFP (negative control; Rev1.4), HIV-1 Rev(1.4)-NES3-EGFP (positive control; Rev1.4NES3), or plasmids encoding HIV-1 Rev(1.4) containing either the predicted NES sequence (amino acids 116 to 129) of the JDV Rev WT protein (JDVRevNESWT) or (B) each of the JDV NES mutated sequences were used. (C) HEK293T cells were transfected and, after an incubation of 24 h, were either left untreated (-) or exposed (+) to both cycloheximide and actinomycin D (C/ActD). Cells were fixed and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). (D) Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in

cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP and DAPI images. The white bars correspond to a length of 10 μ M. CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios. Results (mean Fn/c ratio \pm SEM, for n = 30) are shown for the different proteins. Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, in presence or absence of C/ActD, between the JDVRevNESWT-containing HIV-1 Rev(1.4) protein and the HIV-1 Rev(1.4) protein containing each of the JDV Rev NES mutated sequences are indicated by *** (P < 0.0005) and **** (P < 0.00005).

The predicted NES sequence (aa 116 to 129) of JDV Rev was inserted into the pRev(1.4)-EGFP vector (Fig. 2.6A) as well as sequences containing various single alanine substitutions targeting hydrophobic aa (methionine, leucine, phenylalanine and valine) of the putative JDV Rev NES (Fig. 2.6B). HEK293T cells were transfected with each of the construct and, after an incubation of 24 h, were left untreated or treated with cycloheximide/ActD for 3 h. To evaluate the strength of each of the inserted JDV Rev NES sequences (WT or mutated), the Fn/c ratios were calculated. As expected, the HIV-1 Rev(1.4)-EGFP protein (Rev1.4) lacking a functional NES exclusively localized to the nucleus and nucleolus of transfected cells in presence of cycloheximide/ActD with a Fn/c ratio of 13.35 (Fig. 2.6C). In contrast, the HIV-1 Rev(1.4)-NES3-EGFP protein (Rev1.4-NES3) which contains an intact HIV-1 Rev NES, localized mainly to the cytoplasm of cycloheximide/ActD-treated cells with a Fn/c ratio of 0.58. Insertion of the JDV Rev WT predicted NES sequence within the vector resulted in the localization of the HIV-1 Rev-EGFP protein (JDVRevNESWT) in the cytoplasm of the transfected cells treated with cycloheximide/ActD with a resulting Fn/c ratio of 0.91. Similarly, low Fn/c ratio results were obtained with the M116A and V129A mutants, suggesting that both M116 and V129 residues have no role in NES function of JDV Rev. In contrast, all the other single substitutions in the JDV NES sequence had an impact on the subcellular localization of the HIV-1 Rev. The L119, F123A, L126A and L128A mutations had a negative impact on the export of the protein with Fn/c ratios of 7.45, 11.64, 8.86 and 5.78, respectively (Fig. 2.6C and D). All these results were confirmed by the RNA export assay using the pRRE-HIV CAT reporter construct (pDM128) (Bogerd et al., 1998). Indeed the HIV-1 Rev export activity was significantly lower for mutants L119A, F123A, L126A and L128A when compared to that of the HIV-1 Rev proteins containing either the predicted sequence of JDV Rev NES (JDVRevNESWT) or the intact

HIV-1 Rev NES sequence (Rev1.4NES3) used as a positive control ($P < 0.005$) (Fig. 2.7). Moreover, the M116A mutation affected negatively the export activity of HIV-1 Rev ($P < 0.05$). Altogether, these results showed that residues 119L, 123F, 126L, and 128L are mandatory for the JDV Rev NES function, whereas the residue 116M also impacts this function.

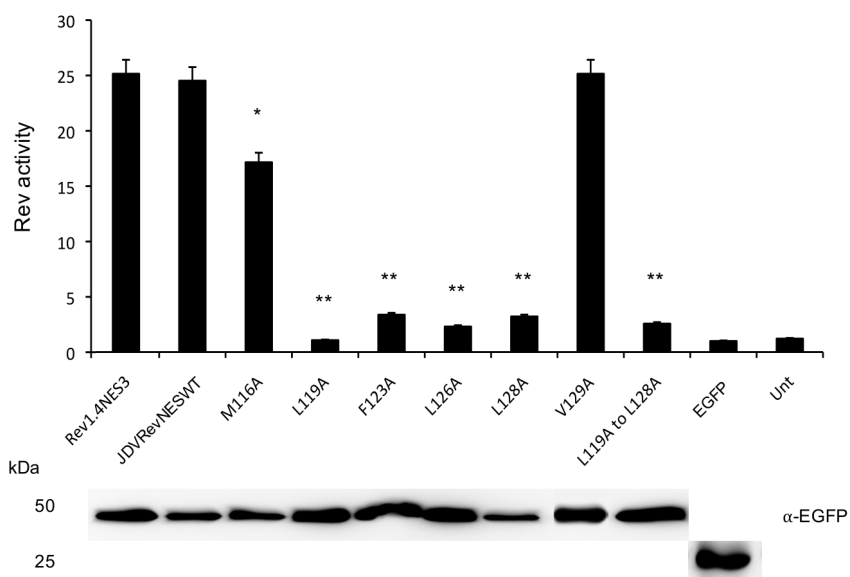


Figure 2.7. The nuclear export activity of HIV-1 Rev containing JDV Rev WT or mutated NES sequences.

The nuclear export activity of the EGFP-fused HIV-1 Rev proteins described in Figure 6 was determined using a CAT reporter assay. The CAT expression data were normalized to the expression level of the proteins as determined by Western blot using an EGFP-specific antibody (bottom of the figure). Rev activity was then determined as the ratio of HIV-1 Rev protein CAT expression harboring the HIV-1 Rev NES WT (NES3), the JDV Rev NES WT or the JDV Rev NES mutant to the basal expression from pDM128 construct co-transfected with empty pEGFP-C1 only. The mean Rev activity values + SEM were obtained from three independent experiments (triplicate samples per experiment). Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT NES and each of the JDV Rev NES mutant proteins are indicated by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.005$). Unt: untransfected cells.

2.5. Discussion

The Rev and Rev-like proteins of complex retroviruses/lentiviruses are regulatory proteins that mediate the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. To exert their function, the Rev proteins shuttle between the nucleus and cytoplasm through the involvement of import and export cell receptors that interact with the Rev NLS and NES, respectively. Moreover, lentiviruses like HIV-1 and BIV, and presumably all other lentiviruses, target the Rev protein to the nucleolus via NoLS (Kubota et al., 1989; Gomez Corredor and Archambault, 2009).

This study reports for the first time the subcellular distribution of the JDV Rev protein and the localization of the NLS, NoLS and NES in the protein. As mentioned above, no *in vitro* cell systems permissive for JDV replication have been reported so far. Consequently, the subcellular distribution experiments were conducted in cells transiently transfected with appropriate JDV Rev-encoding plasmid constructs, as previously described by us to characterize in detail the BIV Rev protein [Gomez Corredor and Archambault, 2009; Gomez Corredor and Archambault, 2012]. Here it was first demonstrated that the JDV Rev protein fused to EGFP localized predominantly to the cytoplasm and the nucleolus (Fig. 2.1). This result is similar to that described for HIV-1 Rev (Cochrane et al., 1990), but contrasts with the BIV Rev subcellular localization, which is predominantly nuclear/nucleolar (Gomez Corredor and Archambault, 2009). By using several deletion and alanine substitution mutants we identified the aa region necessary for the localization of JDV Rev in the nucleus. The subcellular localization of both JM4 and JM5 deletion mutants contrasted with the cytoplasmic and nucleolus distribution of JDV Rev WT. These two proteins were distributed mostly in the cytoplasm for mutant JM4 with a faint presence in the nucleus, or in the cytoplasm/nucleus but not in the nucleoli for mutant JM5. In addition, the Rev nuclear export activity of both mutants JM4 and JM5 was completely abolished in the CAT reporter assay (Fig. 2.2). These results indicated that the sequences deleted in mutants JM4 and JM5 (aa 73 to 92 and aa 93 to 112, respectively) were important for the subcellular localization and biological activity of JDV Rev. The sequences deleted in mutants JM4 and JM5 were then analyzed and revealed the

presence of a region rich in basic residues, essentially arginines, from aa 74 to 105 that would be potentially associated with NLS/NoLS functions. This assumption was confirmed when this region fused to the C-terminus of EGFP, EGFP-βGal or EGFP-GST relocated these proteins to the nucleus and nucleolus (Fig. 2.3). In order to identify which basic aa were at play for the NLS function of JDV Rev, a series of point mutations were generated within the 74 to 105 aa region of the protein targeting the arginine (R) residues. The results obtained with Mut11 to 14 mutants showed that the ⁷⁶RR-RR-RR⁸⁶ aa cluster undoubtedly was important and sufficient for the NLS function of JDV Rev. This indicated that the NLS of JDV Rev has a monopartite-like structure and is composed of ⁷⁶RR-RR-RR⁸⁶. Thus, the JDV Rev NLS differs from the bipartite structure of BIV Rev NLS but resembles that of HIV-1, as it is composed exclusively of arginine residues (Table 2.1).

Table 2.1. Retroviral Rev and Rev-like NLS/NoLS sequences

Protein ¹	NLS/NoLS ²	Reference
HIV-1 Rev	RQARRN <u>RRRR</u> WRERQRQ	Kubota et al., 1989
EIAV Rev	KRRRK	Harris et al., 1998
MMTV Rem	ALRRKRRREM RK	Indik et al., 2005
HERV-K Rec	RRRR HRNRAP	Yang et al., 1999
HTLV-1 Rex	<u>PKTRRRR</u> <u>PRRSQ</u> <u>RKR</u> PPTP	Kubota et al., 1989
BIV Rev	RARKLPGERR <u>PGFWKSLRELVEQN</u> RRKQERR	Gomez Corredor and Archambault 2009
JDV Rev	<u>RGRRP</u> <u>ARRPP</u> <u>IRRH</u> PSFWGTLRGLVSEA <u>QRRQ</u>	This study

¹Abbreviations: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; EIAV, equine infectious anemia virus; MMTV, mouse mammary tumor virus; HERV-K, human endogenous retrovirus K; HTLV-1, human T-lymphotropic virus 1; BIV, bovine immunodeficiency virus; JDV, Jembrana disease virus.

²The basic residues associated with NLS are shown in bold; the NoLS residues are underlined.

The nucleolus is the largest subnuclear structure that comprises the fibrillar center, the dense fibrillar center (DFC) and the granular component (GC) (Emmott and Hiscox, 2009). Beside its well-known role in rRNA synthesis, the nucleolus can play a role in replication of certain viruses (Rawlinson, 2015). Indeed, viruses may encode proteins that enter the nucleus and/or nucleolus and then interact with different partners to allow or improve steps of the viral replication cycle (Salveti and Greco, 2014). For instance, the Rev protein of BIV and HIV-1 were demonstrated to interact with the B23 nucleolar protein and this interaction was shown to be critical in the replication of these viruses (Fankhauser et al., 1991; Passos-Castilho et al., 2018).

The targeting of a protein to the nucleolus relies on the presence of a NoLS that can be monopartite, bipartite or tripartite in structure (Emmott et al., 2008; Lange et al., 2010; Hahn and Marsh, 2007; Dang and Lee, 1989) or, in the absence of the latter, on interactions with nucleic acids or other NoLS-containing proteins (Emmott and Hiscox, 2009). Herein it was shown that the JDV Rev protein colocalized with the nucleolar marker nucleolin, known to be present in both GC and DFC nucleolus regions (Emmott et al., 2008). This nucleolar localization was dependent on the presence of a NoLS that was shown to be composed of the arginine residue at position 74 (74R), in addition to the ⁷⁶RR-RR-RR⁸⁶ and ¹⁰³RR¹⁰⁴ arginine residues. Therefore, the JDV Rev NoLS is bipartite in structure and differs from the NLS, intrinsically associated-monopartite structure of the NoLSs of HIV-1 Rev and Human T cell leukemia virus Rex proteins, and from the BIV Rev NoLS present in the spacer sequence that delimits the two BIV Rev NLS motifs (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Combined together, the JDV Rev protein contains a novel type of NoLS among previously described retroviral Rev or Rev-like proteins.

The NLS/NoLS and RBD motifs in several Rev and Rev-like proteins in complex retroviruses are associated with arginine-rich domains (Pollard and Malim, 1998; Hope et al., 1991; Magin et al., 2000). In the present study, the nuclear export activity of the JDV Rev NLS/NoLS mutants targeting the arginine residues was diminished (Mut2, Mut4, Mut6, Mut7

and Mut11) or almost absent (Mut8, Mut10 and Mut12 to Mut16) even though a few protein mutants still localized to the nucleoplasm and/or nucleolus (Fig. 2.4, and 2.S3). These results suggest that the arginine residues composing the NLS/NoLS are likely part of the RBD that mediates the binding of Rev to the RRE of the viral transcripts, ensuring their transport to the cytoplasm where they are translated. This overlapping of the NLS and the RBD prevents the Rev-viral RNA complexes from going back in the nucleus where the RNA would be spliced (LaCasse and Lefebvre, 1995).

To fulfill its function, the Rev protein must be exported from the nucleus to the cytoplasm. CRM1 (also known as exportin 1) is a member of the karyopherin β family proteins and binds leucine-rich NES for the nuclear export of a protein. HIV-1 and cyclic-AMP-dependent PKI were the first proteins identified harboring a leucine-rich NES that was shown to specifically interact with CRM1. Other cellular and viral proteins with NES were thereafter identified and NES consensus sequences were established and then classified into the HIV-1 Rev class or the PKI class (Henderson and Eleftheriou, 2000). The present study showed that the JDV Rev protein contains a NES that is CRM1-dependent, as demonstrated by the nuclear export blockage of the protein in presence of LMB (Fig. 2.1). This result is in accordance with the fact that the lentiviral Rev proteins characterized so far are CRM1-dependent for their nuclear export (Gomez Corredor and Archambault, 2012; Otero et al., 1998; Askjaer et al., 1998). The Rev sequence deleted in mutant JM6 (aa 113 to 132) was shown to contain a NES as this mutant accumulated in the nucleus of transfected cells regardless of the LMB treatment (Fig. 2.2). Bioinformatics analysis of this region indicated a stretch of 14 residues ($^{116}\text{M-A-E-L-E-E-R-F-E-D-L-A-L-V}^{129}$) predicted to serve as a NES. When this sequence was analyzed using the Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay it was able to recover the NES activity of the HIV-1 Rev protein as determined by the subcellular localization of the protein and the resulting Fn/c ratios (Fig. 2.6). Generating mutants targeting the M, L, F and V hydrophobic residues revealed that 119L, 123F, 126L and 128L were key-residues for the NES function of JDV Rev and that the 129V was not part of the NES. Even though the 116M residue seemed dispensable for the NES function based on the result obtained with mutant M116A in the Rev(1.4)-EGFP nuclear export assay, a decrease in the

Rev activity of this mutant, as determined in the CAT reporter assay, was observed (Fig. 2.7). Therefore, this result showed a role for 116M, albeit minor, in the NES function. Combined, these results indicated that the NES sequence of JDV Rev is ¹¹⁶M-A-E-L-E-E-R-F-E-D-L-A-L¹²⁸ where the residues associated with nuclear export are indicated in bold type.

The NES of the PKI protein is composed of four key hydrophobic residues with the Φ 1XXX Φ 2XX Φ 3X Φ 4 consensus sequence where Φ represents hydrophobic residues (Table 2.2) (Güttler et al., 2010). It has been shown that a fifth residue (Φ 0) can enhance the export activity of PKI by reinforcing its interaction with CRM1. Therefore, another consensus sequence (Φ 0XX Φ 1XXX Φ 2XX Φ 3X Φ 4) was defined for the PKI NES class (Emmott et al., 2008). Thus, the JDV Rev NES belongs to the latter consensus sequence of the PKI class with the 116M, 119L, 123F, 126L and 128L residues corresponding to the Φ 0, Φ 1, Φ 2, Φ 3 and Φ 4 hydrophobic residues, respectively (Table 2.2). Consequently, this result obtained for the JDV Rev NES contrasts with the NES consensus of the HIV-1 Rev class. It was also demonstrated that the nature of the Φ residue at any position in a NES sequence of a protein can also impact the strength of its interaction with CRM1 (Güttler et al., 2010). This was shown by using several substitution mutants targeting the PKI NES such that optimal residues at the Φ positions were identified (Table 2.3). Accordingly, the JDV Rev NES corresponds to one of the most optimal consensus sequences of the PKI NES. Combined, the results reported here agree with those of a previous report where a NES of the PKI class harboring five hydrophobic aa was described for the BIV Rev protein (Gomez Corredor and Archambault, 2012). However, the BIV Rev NES sequence corresponds to a PKI NES consensus sequence that is less optimal than that of the JDV Rev NES.

Table 2.2. PKI, HIV-1 and JDV Rev NES sequences

Class consensus sequence	Sequence ¹
PKI class NES	
Former consensus	Φ¹XXXΦ²XXΦ³XΦ⁴
PKI WT NES	S N E L A L K L A G L D I
New consensus	Φ⁰XXΦ¹XXXΦ²XXΦ³XΦ⁴
Optimal PKI NES	I N E L A L K L A G L D I
HIV-1 Rev NES	
New consensus	Φ⁰Φ¹XΦ²XXΦ³XΦ⁴
New Rev NES	L Q L P P L E R L T L
JDV Rev NES	
Consensus	Φ⁰XXΦ¹XXXΦ²XXΦ³XΦ⁴
Rev NES	M A E L E E R F E D L A L

¹The hydrophobic residues composing the NES are shown in bold type (adapted from Güttler et al., 2010).

Table 2.3. Hydrophobic residues for PKI NES optimal binding to CRM1

Position	Residues ¹
Φ ₀	I = V = M > L > A = Y > F = W > P
Φ ₁	L > I > V = M > F > A > W
Φ ₂	F = M > L > I = V > Y > W
Φ ₃	L = M > I > V > F > W = A
Φ ₄	L > I > M > V > F

¹The amino acids composing the most optimal consensus sequence of PKI NES are shown within the box (adapted from Güttler et al., 2010).

In conclusion, the results of this study demonstrated that the nucleolar and nuclear localizations of the JDV Rev protein are mediated via NLS and NoLS aa motifs, the latter being novel among Rev and Rev-like proteins. It was also shown that the NES of JDV Rev belongs to the PKI class. It also corresponded to the most optimal consensus sequence of PKI NES and, as such, is novel among lentivirus Rev protein NES. Knowledge of the modes of action and variations among the lentiviral Rev proteins may provide additional targets for drug therapy design against lentiviral infections.

2.6. Acknowledgments

C. Marchand was supported by a graduate studentship from the "Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologie " and partial support from the "Faculté des Études Supérieures of Université de Montréal". This work was supported by an operating "Discovery" research grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPN-2016-06532) to D. Archambault. The authors wish to thank Dr Yves Prairie, Université du Québec à Montréal, for his advice on statistics.

2.7 Supplementary Materials

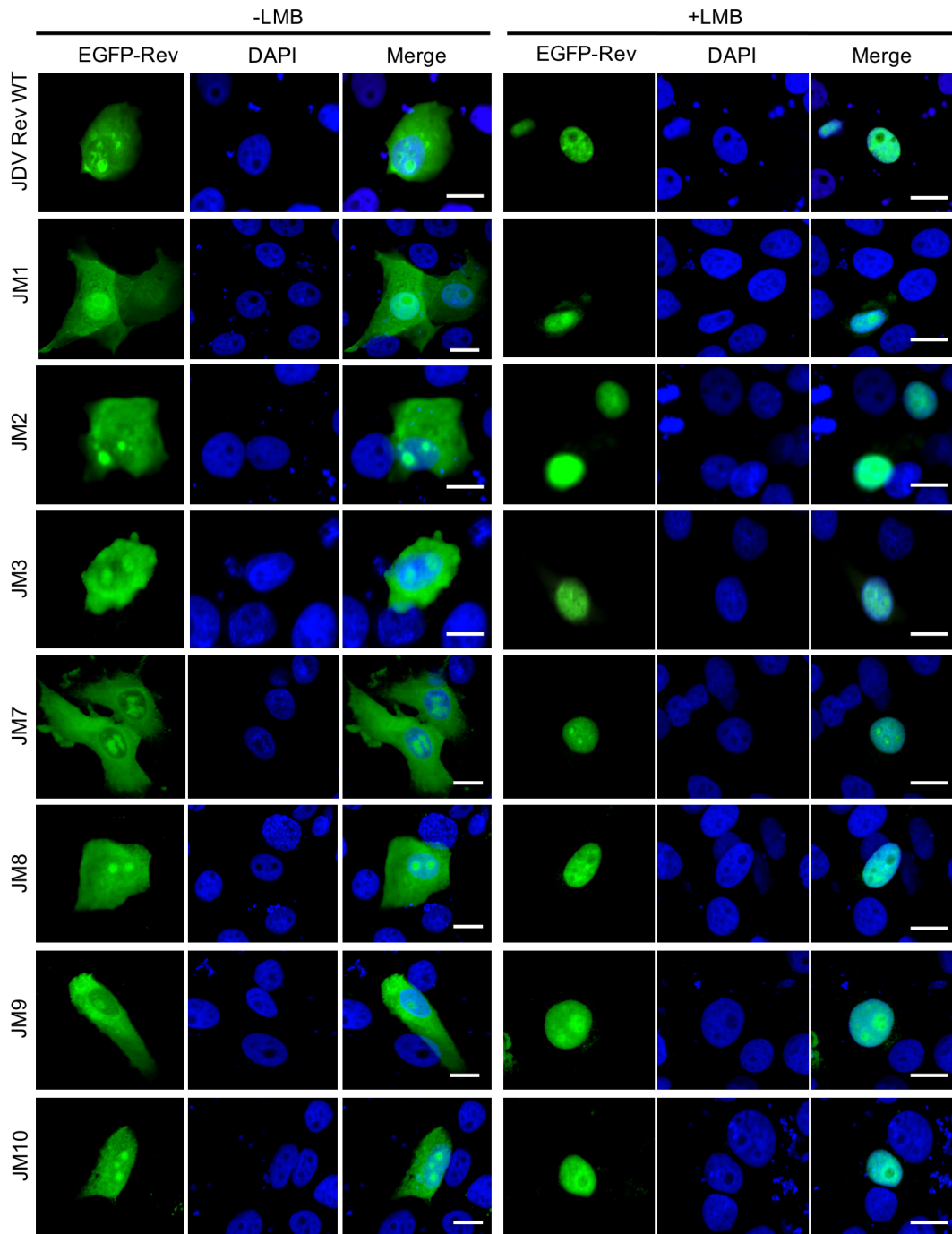


Figure 2.S1. Subcellular localization of JDV Rev deletion mutant proteins fused to EGFP.

Microscopic analysis of Rev deletion mutant proteins fused to EGFP (in green) expressed in MDBK cells 24 h post transfection in absence (-) or presence (+) of leptomycin B (LMB). Cells were fixed and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images shown are representative of expression pattern observed in 30 cells from three independent experiments (10 cells per experiment). The white bars correspond to a length of 10 μ M.

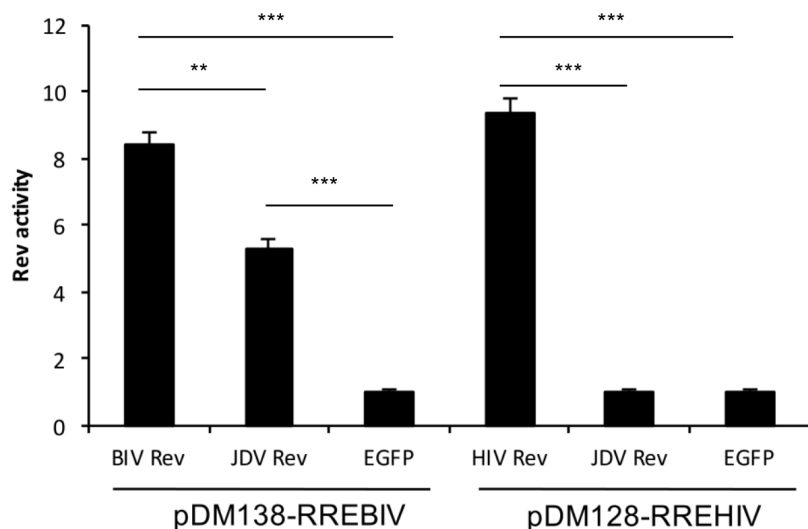


Figure 2.S2. Nuclear export activity of JDV Rev with heterologous lentiviral Rev Response elements (RRE).

Nuclear export activity of EGFP-JDV Rev, EGFP-BIV or EGFP-HIV-1 Rev proteins expressed from the appropriate pEGFP-C1 vectors using either the BIV (pDM138) or HIV-1 (pDM128) RRE sequence was determined using a CAT reporter assay. The CAT levels were normalized to the Rev expression as determined by Western blot analysis. Rev activity was determined as the ratio of CAT expression to the basal expression from pDM128 or pDM138 constructs co-transfected with empty pEGFP-C1. The Rev activity mean values + the standard error about the mean (SEM) were obtained from three independent experiments (triplicate samples per experiment). Significant differences between the EGFP proteins, using a one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's multiple-comparison test, are indicated by ** ($P < 0.005$) and *** ($P < 0.0005$).

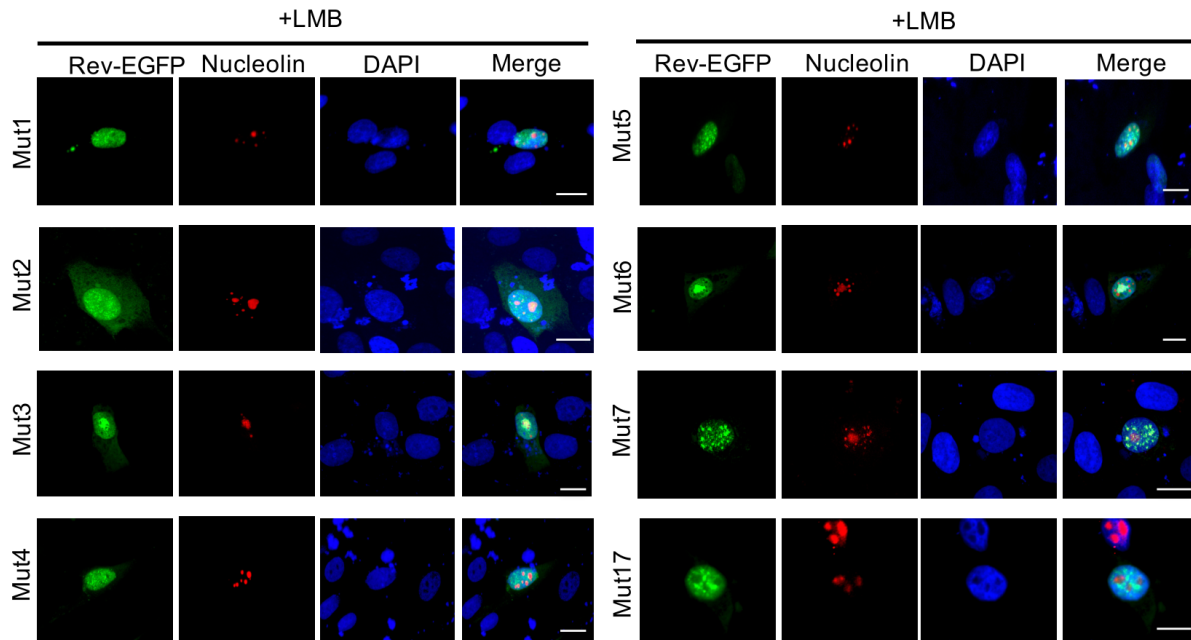


Figure 2.S3. Subcellular localization of JDV Rev alanine substitution mutant proteins.

MDBK cells were transfected with each of the mutant plasmid constructs and incubated for 24 h. Cells were treated with leptomycin B (LMB) for 5 h or left untreated and then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Only the results obtained from cells in presence (+) of LMB are shown. The white bars correspond to a length of 10 μ M.

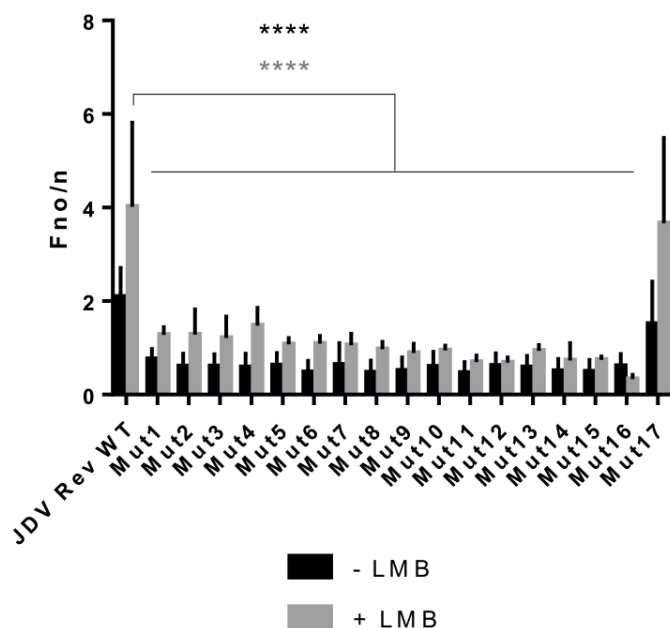


Figure 2.S4. Nucleolar localization of the JDV Rev alanine substitution mutant proteins.

MDBK cells were transfected with the plasmid constructs encoding either the JDV Rev WT protein or each of the JDV Rev mutant proteins (Mut1 to Mut17), and incubated for 24 h. Cells were left untreated or treated with 5 nM of leptomycin B (LMB) for 5 h and then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection and counterstained with DAPI for nucleus visualization. CLSM images were obtained at 60x magnification from three independent experiments (10 analyzed cells per experiment). The images were analyzed to determine the Fno/n ratios. Results (mean Fno/n ratio \pm the standard error about the mean (SEM), for n = 30) are shown for the JDV Rev WT protein and each of the alanine substitution mutant proteins. Significant differences, using an ANOVA followed by a post-hoc Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the deletion mutants, with and without LMB treatment, are indicated by **** ($P < 0.00005$).

Chapitre III: Identification des signaux de localisation nucléaire et nucléolaire de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience féline

L'objectif général de ce chapitre était de localiser le NLS et le NoLS de la protéine Rev du VIF. La composition en acides aminés a ensuite été déterminée à l'aide de mutants de la protéine Rev du VIF.

Ce chapitre présenté sous forme d'un article scientifique a été soumis et accepté avec modifications dans la revue « Virus Research » le 25 mai 2020. La conception et la réalisation des expériences ainsi que les analyses ont été faites par l'auteur de cette thèse (Claude Marchand). La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par l'auteur de cette thèse. Les professeurs Guy Lemay et Denis Archambault ont contribué de manière importante à la réalisation de cette étude en apportant leur expertise scientifique avisée et leurs commentaires judicieux. Le Professeur Denis Archambault a contribué à la conception du projet et au support financier. L'ensemble des références sont présentées à la fin de la thèse.

Résumé

Le génome des lentivirus code pour une protéine régulatrice essentielle pour la réplication du virus appelée Rev. La protéine Rev se lie aux ARN viraux partiellement et non épissés et assure leur exportation nucléaire. Par conséquent, Rev possède des domaines fonctionnels qui lui permettent de transiter entre le cytoplasme et le noyau. Le virus de l'immunodéficience féline (VIF), un lentivirus, peut entraîner un syndrome d'immunodéficience après une longue période d'incubation, similaire à celle associée au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Jusqu'à présent, les domaines fonctionnels de la protéine Rev du VIF n'étaient prédits que par homologie avec ceux de la protéine Rev du VIH-1. Dans la présente étude, les signaux de localisation nucléaire et nucléolaire (NLS et NoLS, respectivement) de la protéine FIV Rev ont été examinés. Des mutants de délétion de la protéine Rev du VIF en fusion avec la protéine fluorescente verte (EGFP) ont été utilisés pour localiser la région du NLS entre les acides aminés (aa) 81 à 100. En utilisant des mutants de substitution alanine, des résidus basiques entre les acides aminés 84 à 99 ont été identifiés comme important pour la fonction NLS. Les résidus basiques aux positions 82 à 99 étaient également associés au NoLS. Ces NLS et NoLS ressemblent davantage à ceux de la protéine Rev du VIH-1 qu'à ceux retrouvés dans d'autres protéines Rev animales connues.

Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the Feline immunodeficiency virus Rev protein

Claude Marchand^{1,2}, Guy Lemay² and Denis Archambault¹

¹Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada; ²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

3.1 Abstract

Lentivirus genomes code for a regulatory protein essential for virus replication termed Rev. The Rev protein binds to partially and unspliced viral RNAs and mediates their nuclear export. Therefore, Rev possesses functional domains that allow its shuttling between the cytoplasm and the nucleus. The Feline immunodeficiency virus (FIV), a lentivirus, can lead to an immunodeficiency syndrome after a long incubation period, similar to that associated with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The FIV Rev protein functional domains have only been predicted so far by homology with those of HIV-1 Rev. In the present study, the nuclear and nucleolar localization signals (NLS and NoLS, respectively) of the FIV Rev protein were examined. A series of FIV Rev protein deletion mutants fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) were used to localize the NLS in a region spanning amino acids (aa) 81 to 100. By using alanine substitution mutants, basic residues between amino acids (aa) 84 to 99 of the FIV Rev protein sequence were identified to compose the NLS whereas those between aa 82 to 99 were associated a NoLS function. These results further enlighten our understanding of how the Rev protein exerts its role in the life replication cycle of lentiviruses.

3.2. Introduction

The Feline immunodeficiency virus (FIV) was first described in 1987 by Niels Pedersen and co-workers as the causative agent of a fatal immunodeficiency syndrome observed in cats housed in a cattery in Petaluma, California (Pederson et al., 1987; Yamamoto et al., 1988). The acute phase of FIV infection resembles that of the Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in humans with a sharp decrease in CD4+ T lymphocytes and high levels of viral RNA in circulating blood. This phase lasts about a month and is followed by a prolonged asymptomatic phase during which circulating viruses are at a low level together with the establishment of a virus-latently infected cells reservoir (Hartmann, 2012). The period between initial FIV infection and the immunodeficiency terminal stage is about 7–9 years (Yamamoto et al., 1988). During that period, a progressive decline of CD4+ T lymphocytes occurs and results in an important susceptibility to opportunistic infections (Miller et al., 2018).

The FIV proviral DNA genome (approximately 9,500 Kb in length, depending on the isolate) resembles that of HIV-1 and other lentiviruses. Long terminal repeats (LTR) are found at both ends flanking three large open reading frames (ORFs), namely *gag*, *pol*, and *env* genes, that encode internal structural proteins, reverse transcriptase and other viral enzymes, and envelope proteins, respectively (Peacon-Slattery et al., 2008). The FIV genome also contains small ORFs encoding various regulatory and accessory proteins. Only the regulatory of expression of virion (*rev*) and *vif* and *orf-A* accessory genes have been characterized so far in FIV (Gemeniano et al., 2003).

The FIV Rev protein is a 23 kDa protein [153 amino acids (aa)] that is expressed early in the replication cycle from two exons of the *rev* gene that are derived from the *env* gene (Kenyon and Lever, 2011). As for HIV-1 Rev, the FIV Rev protein is a nuclear/nucleolar protein that binds as multimers to the so-called cis-acting regulatory "Rev-responsive element" (RRE) structure contained within the unspliced and singly spliced viral mRNAs to promote their nuclear export to the cytoplasm. It also increases stability and translation of the viral

RNAs (Kiyomasu et al., 1991; Phillips et al. 1992; Tomonaga et al. 1993). Like the Rev protein of other lentiviruses, FIV Rev contains at least two main functional domains, namely the RNA binding domain (RBD) and the activation domain (Tomonaga and Mikami, 1996). A third region associated with a multimerization domain is also found in many Rev/Rev-like proteins (Bogerd and Greene, 1993; Madore et al. 1994).

Although small molecules with molecular masses < 40 kDa can freely diffuse through nuclear pore complexes (NPCs) (Timney et al., 2016), most proteins of larger size and protein-nucleic acid complexes require a short aa sequence, termed a nuclear localization signal (NLS), to enter the nucleus whereas a nuclear export signal (NES) is needed for their nuclear export (Marfori et al., 2011). NLSs generally contain a high proportion of positively charged, basic aa. Their localization and number vary among proteins and the aa sequence that compose the NLS can be contained within a contiguous stretch of aa, the so-called monopartite NLS, or may be bi- or multipartite in structure (Dingwall et al., 1991; Garcia-Bustos et al., 1991). The first NLS identified in a protein was of the classical type, and contains an arginine-rich motif recognized by a α/β importin complex in the cytoplasm to allow the transport of the NLS-harboring protein through the NPCs (Freitas and Cunha, 2009). A nucleolar localization sequence (NoLS) is occasionally present in a protein sequence. NoLSs are short targeting sequences responsible for the localization/retention of proteins to the nucleolus (Martin et al., 2015).

The lentivirus Rev protein is a good example of a NLS/NoLS-containing protein that needs to transit between the nuclear/nucleolar and cytoplasmic compartments to exert its function. The FIV Rev protein indeed contains a highly basic region similar to that described for other lentivirus Rev proteins. By analogy, this region is predicted to contain a NLS/NoLS although this has not been experimentally established to date. Although the FIV Rev protein is small enough in size for a karyopherin-independent nuclear transport mechanism (Timney et al., 2016), all lentiviral Rev proteins characterized so far were shown to harbor an NLS that mediates a protein energy-dependent transport (Cochrane et al., 1990; Lee et al. 2006; Gomez Corredor and Archambault, 2012).

In the present study, a monopartite NLS was identified in a region spanning aa 84 to 99 of the FIV Rev protein sequence and was composed of basic aa residues. Importantly, deletion of the Rev NLS or substitution of all basic residues with alanines within the 84 to 99 aa sequence resulted in the retention of the protein in the cytoplasm. Residues important for the nucleolar retention (NoLS) were also identified and were shown to be intrinsically associated with the NLS with the addition of a lysine residue at residue position 82 of the FIV Rev protein sequence.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Cell cultures and transfection

Crandell feline kidney cells (CrFK) (ATCC® CCL-94™) were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, QC, Canada). For transfection, the cells were plated at a cell density of ~ 50% confluence in 24-well cell culture plates for microscopy analyses or in 6-well cell culture plates for Rev activity assays. The next day, plasmids were mixed with Xtreme Gene 9 transfection reagent (Roche, Indianapolis, IN) and added to the cells according to the manufacturer's protocol.

3.3.2. Construction of FIV Rev WT and mutant proteins

The synthetic gene encoding the FIV Rev wild type (WT) protein of the San Diego isolate (GenBank accession number P19032.2) was synthesized through BioBasic Inc. services (Markham, ON, Canada). The gene was cloned into the pEGFP-C1 expression vector (Clontech, Palo Alto, CA) to generate the pEGFP-FIV Rev WT plasmid construct able to produce an enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused to the FIV Rev WT protein (EGFP-FIV Rev WT). FIV Rev mutant (FM) proteins containing internal deletions of 20 (FM1 to FM7) or 13 (FM8) aa were generated from the pEGFP-FIV Rev WT construct by PCR-ligation-PCR mutagenesis (Ali, 1995). Briefly, upstream and downstream blunt-ended cDNA fragments were amplified from the pEGFP-FIV Rev WT plasmid with appropriate

phosphorylated primers (sequences available upon request). The corresponding cDNA fragments were purified and ligated. The ligation products were then amplified by using the forward Rev5' (5'- AACTCGAGTTATGGCAGAAGGGTTTG -3') and reverse Rev3' (5'- AAGAATTCGTCCATAAGCATTCTTTCTATTTCTTC -3') primers that introduced XhoI and EcoRI restriction sites (underlined nucleic acids), respectively. The generated PCR products were then digested with XhoI and EcoRI and cloned back into the pEGFP-C1 expression vector. The N-terminal (FM1) and C-terminal (FM8) mutants were amplified using a forward primer containing an ATG initiation codon and a reverse primer containing a stop codon, respectively.

To generate EGFP-NLS FIV chimeric proteins, the nucleic acids encoding aa 82 to 99 of the FIV Rev WT protein and associated with a putative NLS were amplified by PCR and cloned into the pEGFP-C1 vector as described above. To generate EGFP-GST and EGFP-GST-NLS, the GST-encoding sequence from pGex-4T1 was amplified with appropriate primers and cloned into pEGFP-C1 and pEGFP-NLS FIV, respectively, using the Gibson assembly master mix (New England Biolabs, Ipswich, MA). The EGFP- β Gal and EGFP- β Gal-NLS constructs were similarly generated using the β Gal-encoding sequence derived from pSV- β Gal (Clontech). Where indicated, alanine substitution mutants were introduced into the EGFP-FIV Rev WT protein by PCR site-directed mutagenesis using appropriate primers. All constructs were validated by DNA sequencing through the McGill University Sequencing Services (Montreal, Quebec, Canada).

3.3.3. Fluorescence microscopy

Cells cultured on coverslips in 24-well cell culture plates were transfected with pEGFP-FIV Rev WT or each of the pEGFP-FIV Rev mutants. After an incubation of 24 h and where indicated, 5 nM of leptomycin B (LMB), a known nuclear egress inhibitor of proteins (Kudo et al., 1998), was added to the cell culture medium for 5 h. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3) solution for 15 min. Nucleolin was detected by immunofluorescence to identify the nucleoli (Marchand et al., 2019). Briefly, the cells were permeabilized, blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in

PBS and then incubated with rabbit primary anti-C23 (nucleolin) antibodies (Santa Cruz Biotechnologies Dallas, TX) followed by treatment with Alexa 647-labeled anti-rabbit secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnologies). Coverslips were mounted onto glass slides using ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were imaged by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Nikon A1 confocal system equipped with a 60× oil immersion objective. The NIH ImageJ 1.62 public domain software was used to determine the nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio (F_n/c) which was determined by using the equation: $F_n/c = (F_n - F_b)/(F_c - F_b)$, where F_n is the nuclear fluorescence, F_c is the cytoplasmic fluorescence, and F_b is the background fluorescence (autofluorescence) (Marchand et al., 2019). The same equation was used to determine the nucleolar/nuclear fluorescence ratio (F_{no}/n).

3.3.4. Analysis of transcriptional activity

The FIV Rev protein nuclear export activity was quantified in transient transfection assays using a pDM138-based FIV Rev chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter construct containing the FIV RRE (pRRE-FIV). This construct was generated by cloning the FIV RRE cDNA (Phillips et al., 1992) synthesized through BioBasics Inc. services in the ClaI sites of the PDM138 plasmid to replace the BIV RRE sequence (Gomez Corredor and Archambault, 2009). CrFK cells were seeded in 6-well cell culture plates and cotransfected with 0.5 µg of empty pEGFP-C1 or each of the pEGFP constructs encoding either FIV Rev WT or each of the FIV Rev mutants, and 0,5 µg of pRRE-FIV. Cells were harvested at 48 h following transfection and lysed using the rapid, efficient and rapid (REAP) method described by Suzuki et al. (2010). The amount of CAT in 50 µg of total cellular proteins was determined using a CAT-ELISA kit (Roche). The CAT-ELISA data were normalized to the level of EGFP-FIV Rev protein expression as determined by Western Blot analysis (Li et al., 2004; Marchand et al. 2019). Briefly, 50 µg of total cell extract was electrophoretically separated onto 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS-Tween (0,05%) and incubated with a mouse monoclonal antibody specific to EGFP (Santa Cruz Biotechnologies) followed by treatment with rabbit anti-mouse horseradish peroxidase-

conjugated polyclonal antibodies (Thermo Fisher, Waltham, MA). The signal was detected by enhanced chemiluminescence (BioRad, Hercules, CA). The images were then analyzed with Image J. The FIV Rev protein activity data were generated from three independent transfection experiments for the FIV Rev WT and each of the mutant Rev proteins. The mean Rev activity was expressed as the ratio of EGFP-FIV Rev WT or each of the FIV mutant protein CAT expression to the basal expression of pRRE-FIV in presence of EGFP alone.

3.3.5. Statistics

The experimental results were expressed as mean values + the standard error about the mean (SEM). Statistical analysis was performed by using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA). To compare data from two groups' means, a Student's T-test was used. An ANOVA followed by a post-hoc Dunnett's test (ANOVA Dunnett's test) was used to compare the mean of each of the FIV Rev mutants to that of the FIV Rev WT protein.

3.4. Results

3.4.1. Prediction of the FIV Rev protein NLS by computer analyses

To ensure the nuclear export of viral RNAs, the Rev lentivirus protein must be transported to the nucleus to fulfill its function. Lentiviral Rev proteins characterized so far like that of HIV-1 and BIV possess a NLS that bind to different importins to allow their translocation to the nucleus (Henderson and Percipalle, 1997; Gomez-Corredor and Archambault, 2012). As the NLS of FIV Rev protein was not known, we used first different NLS predictor programs to analyze the aa sequence of the protein. The NucPred program predicted a NLS sequence within the 84-KKKRQRRRRKKK-95 aa sequence of the FIV Rev protein (Brameier and MacCallum, 2007). The cNLS Mapper program defined a monopartite NLS (89-RRRRKKKKAFKK-99) as well as a few bipartite NLSs between aa 82 and 135 of the protein (Kosugi et al., 2009). The NLStradamus program predicted a monopartite NLS composed of the 81-GKMKKKRQRRRRKKKAFKK-99 residues (Nguyen et al., 2009). Finally, the ProteinPredict software (Yachday et al., 2014) identified two sequences located

between aa 71 to 109 and aa 141 to 153 of the protein, respectively. In light of these divergent predictions, experiments were undertaken to precisely identify the region and the aa that compose the FIV Rev protein NLS.

3.4.2. The NLS of the FIV Rev protein is contained within a 20 amino acid region.

To delineate the NLS region within the FIV Rev protein, a series of plasmid constructs encoding FIV Rev mutant proteins (designated FM1 to FM8) containing various deletions were generated (Fig. 1A) and then used to transfect CrFK cells. The expressed mutant Rev proteins fused to EGFP at their N-terminal were examined by confocal microscopy for their subcellular localization at 24 h after cell transfection in presence or absence of LMB (Fig. 1B). As shown in the – LMB panel of Fig. 1B, the full-length FIV Rev WT protein (EGFP-RevFIVWT) exhibited a heterogeneous distribution pattern in the cytoplasm, nucleus and nucleoli of transfected cells. This subcellular localization of the FIV Rev WT protein was similar to that described in FIV-infected cells (Phillips et al., 1992). In presence of LMB, shown previously to inhibit the export of the FIV Rev protein (Otero et al., 1998), the protein indeed was constrained to the nucleus and nucleoli. Mutants FM1 to FM4 and FM8 showed a subcellular distribution similar to that of the FIV Rev WT protein with a cytoplasmic and nuclear/nucleolar localization without LMB treatment, and an exclusive nuclear/nucleolar localization in presence of LMB. In contrast, mutant FM5 showed a cytoplasmic and a faint nuclear localization in absence of LMB and a poor nuclear accumulation in presence of LMB when compared to the FIV Rev WT protein (Fig. 1B and C). Interestingly, mutant FM5 was not observed in the nucleoli of the transfected cells regardless of the LMB treatment. The FM5 mutant results indicated that the deleted sequence (aa 81 to 100) in this mutant contains aa associated with a NLS (and presumably with a NoLS as well) function. As shown by the Fn/c ratio values reported in Fig. 1C, mutant FM6, in absence of cell treatment with LMB, showed a nuclear accumulation that was much higher (significance level of $p < 0.00005$) than that observed for the FIV Rev WT protein. The 101-120 aa sequence deleted in that mutant more likely would contain the NES of the FIV Rev protein. This assumption agrees with the report of Mansuco et al. (1994) where the FIV Rev protein NES was mapped between aa 98 and 121.

Finally, mutant FM7 also showed a nuclear accumulation higher than that of the FIV Rev WT protein at a significance level of $p < 0.05$ which, however, was much lower than that observed above for the FM6 mutant. This FM7 result was not further examined in the present study.

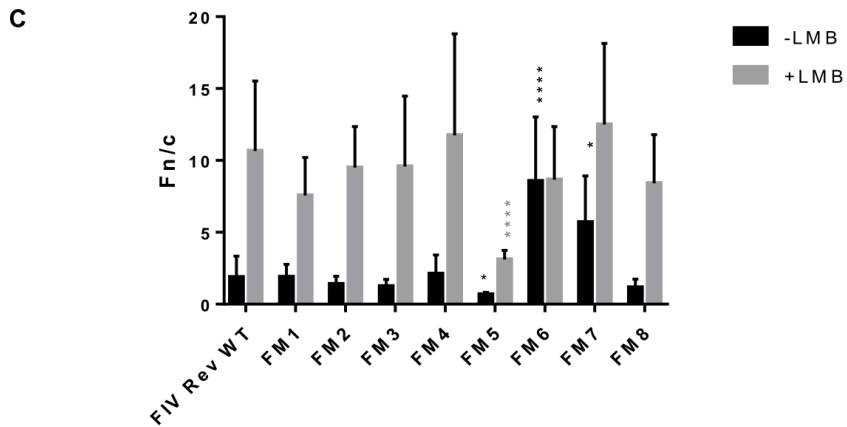
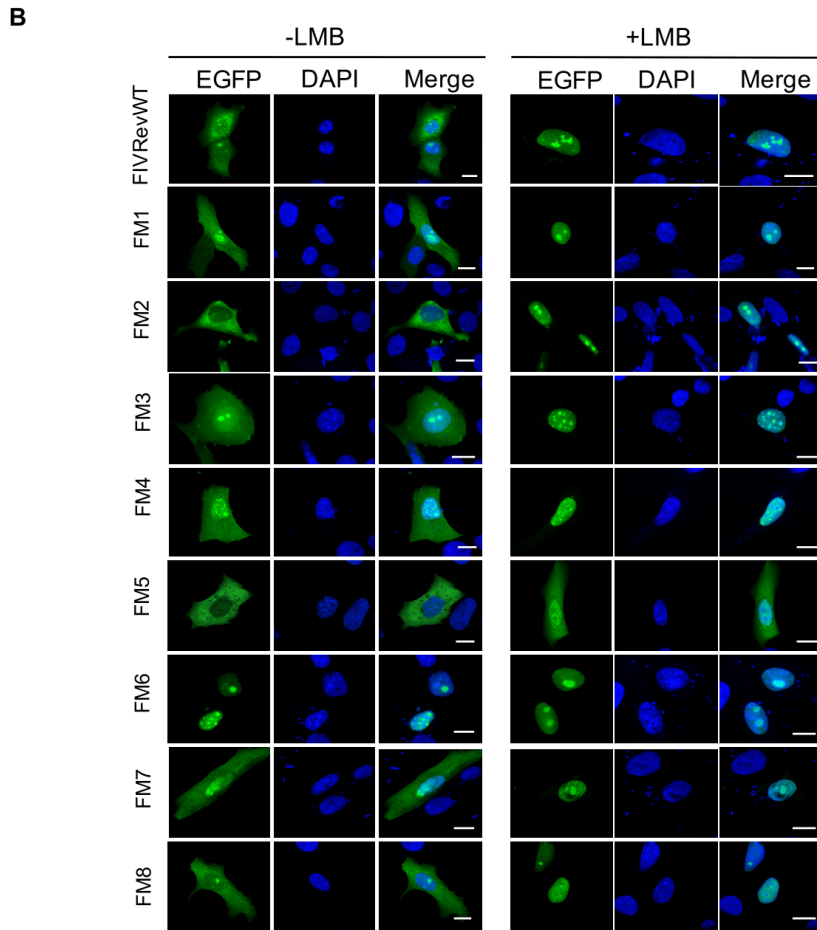
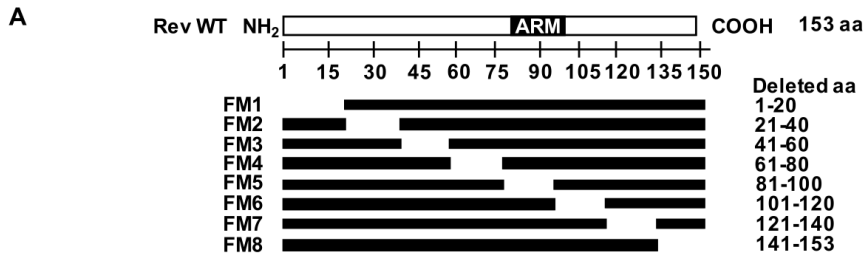


Figure 3.1. Subcellular localization of the FIV Rev deletion mutant proteins.

(A) FIV Rev mutant-encoding sequences were generated from the FIV Rev WT gene by PCR-ligation-PCR and then cloned into pEGFP-C1 for expression of the proteins in fusion with EGFP (FM1 to FM8). ARM: arginine-rich motif. **(B)** Microscopic analysis of the FIV Rev WT and mutant proteins (in green) expressed in CrFK cells at 24 h post transfection. Cells were fixed and treated with DAPI for nucleus visualization (in blue). The merge panel represents the superposition of EGFP-FIV Rev and DAPI images. The white bar indicates a length of 10 μm . Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of expression patterns observed in cells from three independent experiments. **(C)** CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios. Results (mean Fn/c ratio + SEM, for $n = 30$) are shown for the FIV Rev WT protein and each of the deletion mutant proteins. Significant differences between the FIV Rev WT protein and each of the mutant proteins, as determined by an ANOVA Dunnett's test, are indicated by * ($P < 0.05$) and **** ($P < 0.00005$).

After having established the subcellular localization of the FIV Rev WT protein and each of the Rev mutant proteins, it was of interest to determine the impact of the mutations on the nuclear export activity of these proteins. This was done by using a reporter assay based on the export of a CAT-RRE mRNA to the cytoplasm, allowing CAT expression in presence of a functional Rev protein. The export activity of mutants FM1, FM2 and FM7 were comparable to that of the FIV Rev WT protein (Fig. 2). In contrast, mutants FM3 to FM6 and FM8 all showed a significant decrease in their export activity when compared to the WT protein. As explained above, mutant FM6 more likely lacks a fully competent NES, thereby resulting in a poor export activity for this mutant protein. Mutants FM3, FM4 and FM8 showed a lower export activity even though the subcellular localization of these mutant proteins was similar to that of the Rev WT protein. Therefore, sequences deleted in these mutants may contain an important for the export activity of the FIV Rev protein but dispensable for its subcellular localization. Finally, mutant FM5 showed the strongest decrease in its RNA export ability when compared to that of the Rev WT protein. This result was consistent with the negligible capability of mutant FM5 to efficiently enter the nucleus and indicated further the presence of a NLS in the sequence encompassing aa 81 to 100 of the FIV Rev protein.

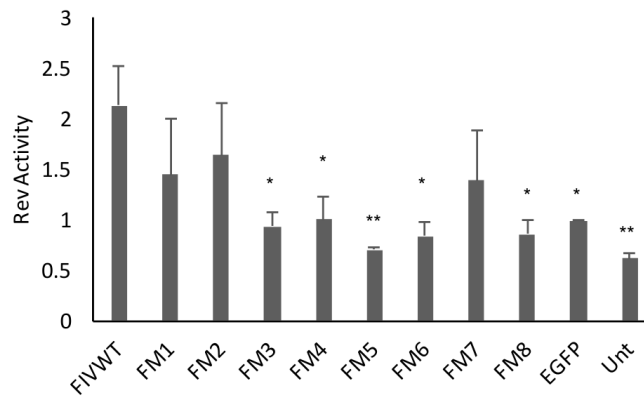


Figure 3.2. The nuclear export activity of EGFP-FIV Rev WT or EGFP-FIV Rev deletion mutant proteins.

The nuclear export activity of EGFP-FIV Rev WT or EGFP-FIV Rev deletion mutant proteins (FM1 to FM8) was determined using a CAT reporter assay. The CAT expression levels were normalized to that of EGFP-FIV Rev WT expression for each protein in cell lysates as determined by Western blot using an EGFP-specific antibody. Rev activity was then determined as the ratio of EGFP-FIV Rev WT or mutant protein CAT expression to the basal expression from pRRE-FIV constructs co-transfected with empty pEGFP-C1 only. The mean Rev activity values + SEM were obtained from three independent experiments (triplicate samples per experiment). Significant differences, using an ANOVA Dunnett's test, between the JDV Rev WT protein and each of the deletion mutant proteins are indicated by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.005$). Unt: untransfected cells.

3.4.3. The FIV Rev protein NLS can direct the nuclear localization of heterologous proteins.

In order to confirm further the NLS nature of the FIV Rev protein, the ⁸²KMKKKRQRRRRKKKAFKK⁹⁹ basic-rich aa sequence, corresponding to most of the region deleted in mutant FM5, was fused to the N terminus of EGFP to examine whether that sequence indeed is sufficient to target heterologous proteins into the nucleus (Fig. 3A). Expectedly, EGFP alone showed a diffuse distribution throughout the transfected cells (Fig. 3B and C). In contrast, the EGFP-FIV NLS chimeric protein accumulated in the nucleus and nucleolus and was absent from the cytoplasm. To ensure that the nuclear localization of EGFP-FIV NLS was dependent upon an active NLS-mediated nuclear import process, we expressed EGFP-FIV NLS infusion with two cytoplasmic proteins, namely the glutathione S-

transferase (GST, 26 kDa) and the β -galactosidase (β -Gal, 464 kDa in its active form) proteins (Fig. 3A) (Guo et al., 2014). The large size of the EGFP-GST-FIV NLS and EGFP- β -Gal-FIV NLS fusion proteins (about 55 and 490 kDa, respectively) ensured that the nuclear localization, if any, would not have been due to a passive diffusion mechanism. EGFP-GST and EGFP- β -Gal fusion proteins localized almost exclusively to the cytoplasm. In contrast EGFP-GST-FIV NLS and EGFP- β -Gal-FIV NLS proteins localized mainly in the nucleus/nucleolus of transfected cells (Fig. 3B and C). These results indicated that the sequence encompassing aa 82 to 99 of the FIV Rev WT protein indeed contains a NLS but also a NoLS that can direct cytoplasmic proteins, herein, EGFP- β -Gal and EGFP-GST, to the cell nucleus and nucleolus.

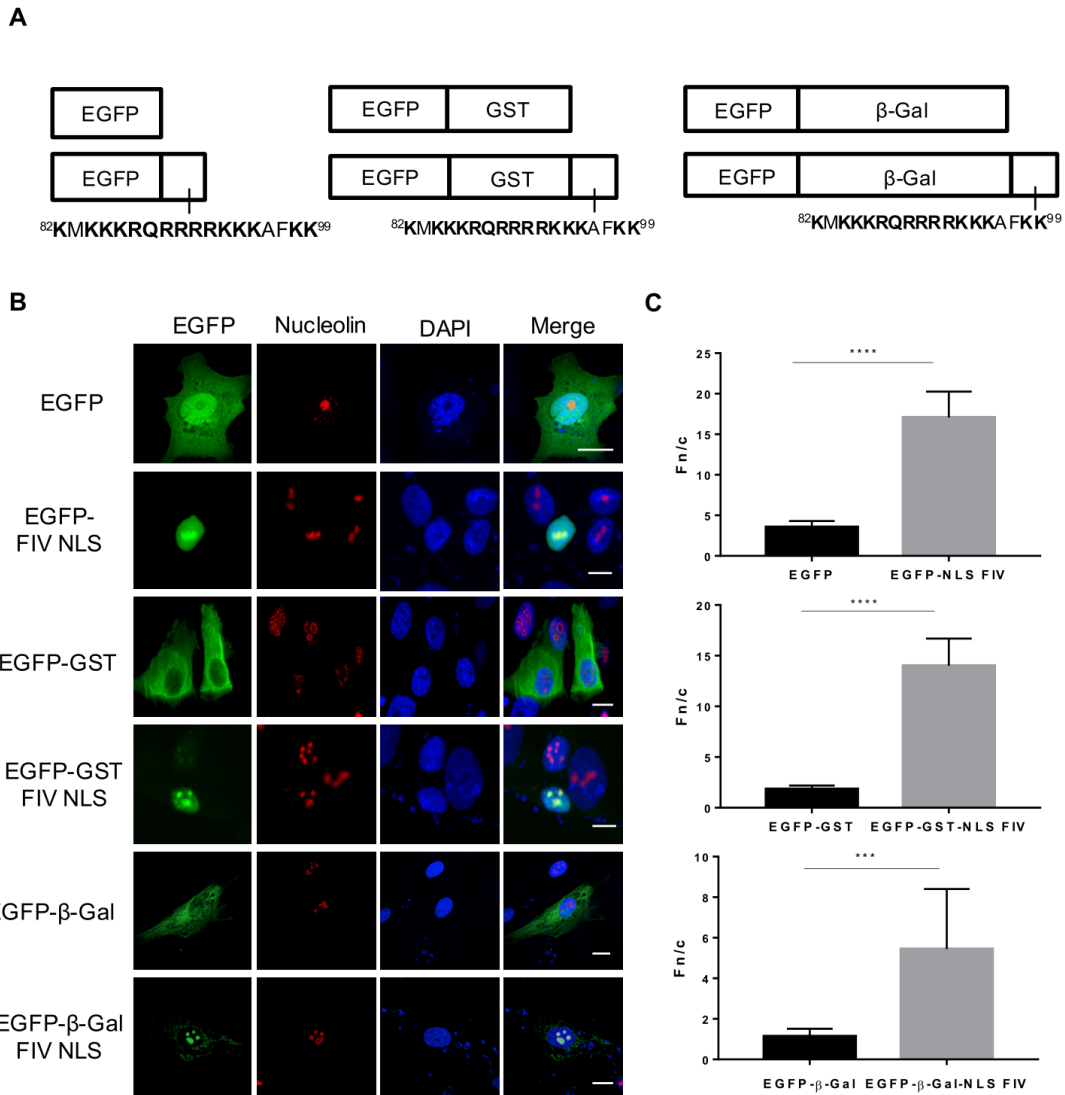


Figure 3.3. The region encompassing aa 82 to 99 of the FIV Rev protein directs heterologous cytoplasmic proteins to the nucleus and nucleolus.

(A) The 82 to 99 aa sequence containing basic residues (in bold) present in the deleted sequence of FIV Rev mutant FM5 was inserted into pEGFP-C1, pEGFP-GST, and pEGFP-β-Gal vectors. **(B)** CrFK cells were transfected with vectors encoding either the EGFP, EGFP-GST or EGFP-GST-β-Gal proteins alone or fused to the 82 to 99 aa sequence of FIV Rev. After an incubation time of 24 h, the cells were fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). The expression of the proteins was detected via the EGFP fluorescence (in green). The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. All images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The white bar indicates a length of 10 μm. **(C)** CLSM images were analyzed to determine the Fn/c ratios. Results (mean Fn/c ratio ± SEM, for n = 30) are shown for the different EGFP proteins. Significant differences between

EGFP, EGFP-GST or EGFP- β -Gal and their counterparts fused to the 82-99 aa sequence of FIV Rev according to a Student T-test, are indicated by *** ($P < 0.0005$), and **** ($P < 0.00005$).

3.4.4. Identification of amino acids composing the FIV Rev protein NLS.

NLSs and NoLSs are usually composed of basic arginine and lysine residues (Dingwall et al. 1991, Lange et al., 2007, Emmott et al., 2008). To ascertain which basic aa are necessary for the NLS function, a series of mutants were generated by site-directed mutagenesis in which the arginine (R) and/or lysine (K) located between aa 82 and 99 of the FIV Rev protein sequence were substituted each with an alanine (A) residue (Fig. 4A). No difference was observed in the Fn/c ratios between the various mutant proteins in absence of LMB when compared to the FIV Rev WT protein. In contrast, mutants MutNLS1 (⁸⁴KKKR⁸⁷), MutNLS2 (⁸⁹RRRR⁹²), MutNLS3 (⁹³KKK⁹⁵), MutNLS4 (⁹⁸KK⁹⁹) and MutNLS6 (⁸⁴KKKR⁸⁷) in presence of LMB showed an important decrease in their Fn/c ratio values, indicating a nuclear accumulation lower than that of the FIV Rev WT protein. No difference in the Fn/c ratios between MutNLS5 (K82A) and the Rev WT protein was observed. Combined, these results indicated that residues 84 to 99 compose the NLS of the FIV Rev protein function whereas residue K82 is dispensable for the NLS function.

The CAT reporter assay was used again to assess the mRNA export activity of the MutNLS 1 to 6 mutants described above. All mutants, to a different extent, exhibited a decreased export activity when compared to that of the FIV Rev WT protein (Fig. 5). Mutants MutNLS3 and 4 showed a slight but significant diminution in their activity. These results are in accordance with the low nuclear accumulation of these mutant Rev proteins (Fig. 4C). In contrast, the export activity of mutants MutNLS1 and 2 was completely abolished. This result agrees with a high and significant decrease of the nuclear accumulation of these mutants (Fig. 4C). Thereof, the important decrease observed in the export activity of MutNLS1 and 2 suggests that the aa substituted in these mutants are important for RNA binding in addition to their role in nuclear import of the FIV Rev protein. As expected, the fully mutated NLS Rev

mutant MutNLS6 showed no export activity at all (Fig. 5). Finally, MutNLS5 showed a slight decrease in its export activity despite its capacity to localize to the nucleus.

A

aa position	82	84	85	86	87	89	90	91	92	93	94	95		98	99		
	G	K	M	K	K	K	R	Q	R	R	R	K	K	A	F	K	K
MutNLS1				A	A	A	A										
MutNLS2									A	A	A	A					
MutNLS3												A	A	A			
MutNLS4																A	A
MutNLS5	A																
MutNLS6				A	A	A	A		A	A	A	A	A		A	A	

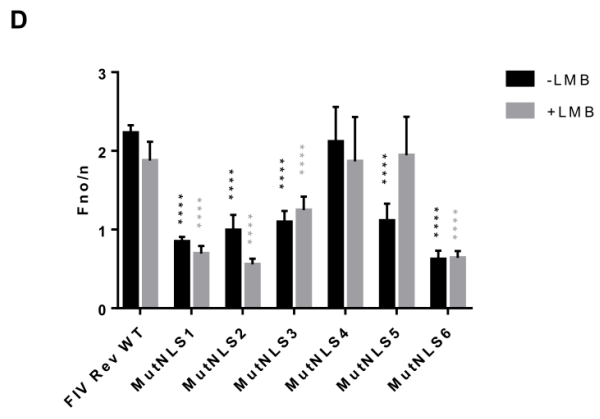
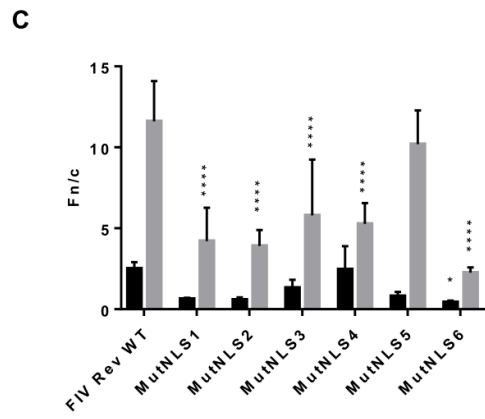
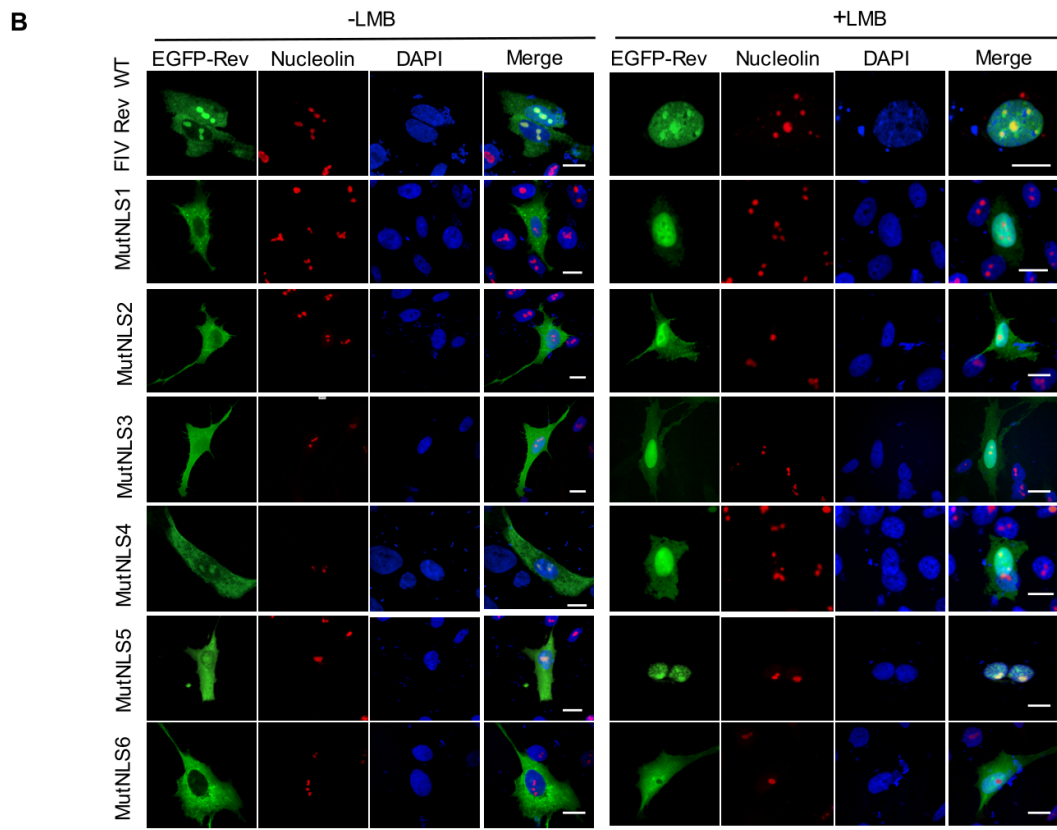


Figure 3.4. Site-directed mutagenesis of the putative FIV Rev NLS/NoLS.

(A) FIV Rev arginine (R) or lysine (K) to alanine (A) substitution mutant proteins (MutNLS1 to MutNLS6) were generated from pEGFP-FIV Rev WT. (B) Subcellular localization of FIV Rev WT and mutant proteins described in panel A. CrFK cells were transfected with each of the mutant constructs and incubated for 24 h. Cells were treated with leptomycin B (LMB) for 5 h or left untreated. Cells were then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images were derived by using CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. The white bar indicates a length of 10 μ m. CLSM images were analyzed to determine the Fn/c (C) and (D) the Fno/n ratios. Results (mean ratio + SEM, for n = 30) are shown for the FIV Rev WT protein and each of the alanine substitution mutants. The values significantly different from the FIV Rev WT protein, according to an ANOVA Dunnett's test, are indicated by * (P < 0.05) and **** (P < 0.00005).

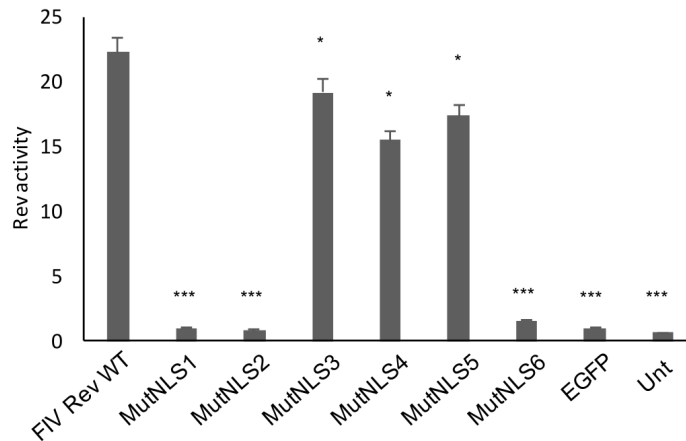


Figure 3.5. Functional analysis of FIV Rev proteins mutated in the NLS region.

The nuclear export activity of the EGFP-FIV Rev WT and each of the EGFP-FIV Rev NLS mutant proteins was determined using the CAT reporter assay. The CAT levels were normalized to the expression level of EGFP-FIV Rev WT or mutant proteins as determined by Western blot analysis. The results represent the mean values of triplicate samples from three independent experiments. The Rev activity of each mutant protein is expressed as the mean ratio of EGFP-FIV Rev WT or mutant protein CAT expression to the basal expression of pRRE-FIV in presence of EGFP only + SEM. The values significantly different from the FIV Rev WT protein, according to an ANOVA Dunnett's test, are indicated by * (P < 0.05) and *** (P < 0.0005). Unt: untransfected cells.

3.4.5. Identification of amino acids important for the nucleolar localization of the FIV Rev protein

To determine which aa mediate the nucleolar localization of the FIV Rev protein, the Fno/n ratios of mutants MutNLS1 to 6 described above were determined. Despite their normal Fn/c ratio values in absence of LMB treatment, the nucleolar localization of mutants MutNLS1 to MutNLS3 was greatly impaired in presence of LMB. An important Fno/n ratio decrease was observed for mutant MutNLS6 (⁸⁴AAAQAAAAAAAAFAA⁹⁹) regardless of the LMB treatment (Fig. 4B and D). On the other hand, a slight Fno/n ratio decrease was obtained for mutant MutNLS5 (K82A) in absence of LMB treatment. Combined these results suggest that residues mutated in these mutants may be important for nucleolar retention. Mutant MutNLS4 Fno/n ratio was not different from that obtained for the FIV Rev WT protein suggesting that the mutated K98 and K99 residues may not be important for the nucleolar localization/retention of the protein (Fig. 4D). Altogether, these results showed that the NoLS is composed of the basic residues present within the ⁸²KMKKKRQRRRRKKK⁹⁵ aa sequence.

As the nuclear import impairment of FIV Rev mutants NLS1 to NLS6 proteins could have negatively influenced their nucleolar localization by reducing the amount of protein that reaches the nucleus, we wished to examine the NoLS results obtained above by another mean. Here the 82 to 99 aa sequence of FIV Rev containing the NLS was mutated by replacing selected cluster basic residues by alanines and each mutated sequence was fused to EGFP (Fig. 6A). CrFK cells were then transfected with each of the plasmid mutant constructs in order to assess the subcellular localization of the chimeric EGFP-NoLSmut1 to 4 proteins. As observed in Fig. 6A, the distribution of EGFP alone was diffuse in the cell with no accumulation in the nucleolus. In contrast and similarly to what was demonstrated above in Fig. 3B, fusion of the FIV Rev NLS 82-99 aa sequence led to an important accumulation of EGFP in the nucleolus (Fig. 6A and B). In contrast none of the cluster mutations in EGFP-NoLSmut1 to 4 was sufficient to completely disrupt the nucleolar retention of the EGFP fusion protein. However, replacement of the 89 to 92 (NoLSmut2) basic residues by alanines showed a significant reduction in the nucleolar localization/retention of the mutant protein, as

demonstrated by the Fno/n ratio, when compared to that of the FIV Rev WT protein NLS sequence (Fig. 6B). Finally, although the Fno/n ratio of MutNLS4 (K98A-K99A) was unaffected in the full length version of the protein (see above and Fig. 4D), mutation of these two K residues in the NLS sequence fused to EGFP resulted in a decreased Fno/n ratio of the EGFP chimeric mutant protein. Consequently, the K98 and K99 were added to the NoLS sequence determined above in section 3.5. Therefore, the combined results from Figures 4 and 6 indicated that all the arginine and lysine residues of the sequence ⁸²KMKKKRQRRRKKKAFKK⁹⁹ contribute to the nucleolar localization/retention of the FIV Rev protein and, thereof, have concluded to compose the NoLS.

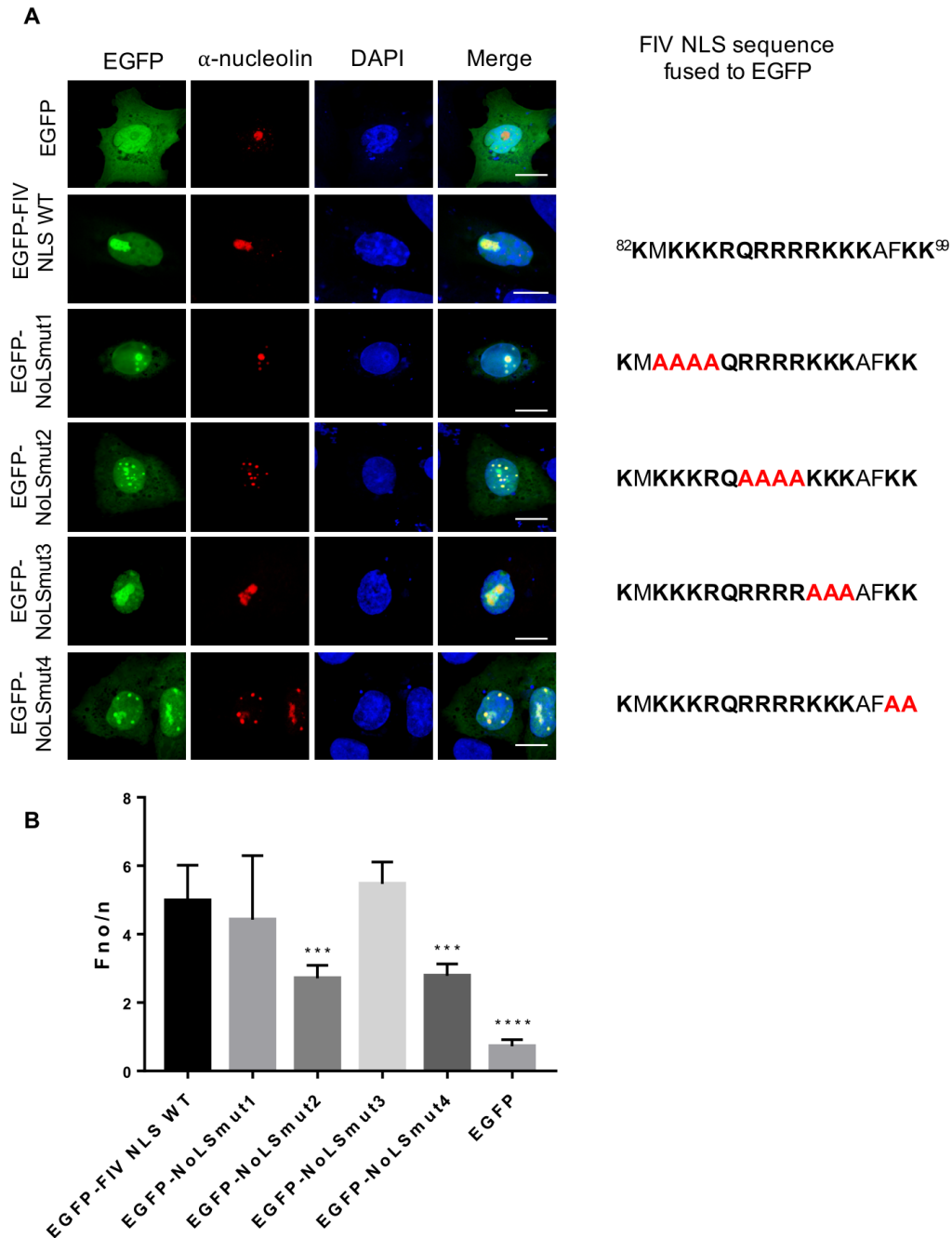


Figure 3.6. Subcellular localization of the EGFP fused to various FIV NLS/NoLS mutant sequences.

(A) FIV Rev arginine (R) or lysine (K) to alanine (A) (in red) substitution mutant sequences (NoLSmut1 to NoLSmut4) were fused to the EGFP. Cellular localization of resultant mutant proteins in CrFK cells transfected with each of the mutant constructs and incubated for 24 h. Cells were then fixed, subjected to immunostaining for nucleolin detection (in red) and counterstained with DAPI for nucleus visualization (in blue). Images were derived by using

CLSM at 60x magnification and are representative of the expression pattern observed in cells from three independent experiments. The merge panel represents the superposition of EGFP, DAPI and nucleolin images. The white bars indicate a length of 10 μm . **(B)** CLSM images were analyzed to determine the Fno/n ratios. Results (mean ratio + SEM, for n = 30) are shown for each of the mutants. The values significantly different from the EGFP-FIV NLS WT, according to an ANOVA Dunnett's test, are indicated by *** (P < 0.0005) and **** (P < 0.00005).

3.5. Discussion

It is recognized that positively charged aa usually compose the NLS of a given protein for its nuclear localization. Deletion of such an NLS from a nuclear protein would lead to its redistribution to the cytoplasm, whereas the addition of a NLS to a heterologous cytoplasmic protein would result in its accumulation in the nucleus. The results of the present study confirmed the localization of the FIV Rev protein in the cytoplasm and nucleus/nucleolus of cells transfected with an appropriate plasmid construct expressing the protein and showed the presence of a NLS in the protein sequence. The basic-rich aa sequence of the FIV Rev protein deleted in mutant FM5 (residues 81 to 100) indeed resulted in redistribution of the protein from the nucleus/nucleolus to the cytoplasm. Moreover, the 82-99 residues within mutant FM5 mutant deleted sequence was sufficient to confer a nuclear localization/accumulation of normally cytosolic proteins (EGFP-GST and EGFP- β -Gal) (Fig. 3). By targeting these latter fusion proteins of large size to the nucleus, the 82-99 aa region was clearly defined as the NLS of the FIV Rev protein.

A few deletion mutants, namely mutants FM3, FM4 and FM8 used to identify precisely the aa composing the NLS of the FIV Rev WT protein, showed a decrease in their export activity despite a subcellular localization similar to that of the WT protein (see Fig. 1 and Fig. 2). As the sequences deleted in mutants FM3 (aa 41 to 60) and FM4 (aa 61 to 80) contain no basic residues that could have been associated with a NLS and/or RBD, the lower activity observed for these mutant proteins could indicate the presence of another Rev export activity functional domain present in the deleted sequences of these mutants, e.g. a

multimerization domain. A multimerization domain within a protein is commonly composed of aa composing a coiled-coil motif in an alpha-helice configuration (Umunakwe et al., 2017). Computational analysis predicted the presence of such a structure from aa 49 to aa 71 of the FIV Rev protein (Umunakwe et al., 2017). As the dimerization of at least two Rev proteins is necessary to allow the RNA transport to the cytoplasm, one can speculate that the deletion of this domain in the FIV Rev protein would lead to a reduced export activity of the protein (Hoffman et al., 2012). Finally, a basic cluster composed of KEKR residue is deleted in mutant FM8. These residues are believed to be part of the RBD and therefore, their deletion would have led to an important decrease in Rev export activity. Further studies are needed to confirm this assumption.

Like the NLSs previously described in HIV-1 and the Equine infectious anemia virus (EIAV) Rev proteins (Böhnlein et al., 1991; Lee, Murphy et al., 2006), the NLS of FIV Rev is monopartite-like in structure and is composed of arginine and lysine residues within the ⁸⁴KKKRQRRRKKKAFKK⁹⁹ sequence of the protein (Table 1). The HIV-1 Rev NLS was shown to be of a non-classical type as it can directly interact with either the importin β or transportin proteins (Henderson et al., 1997; Hutten et al., 2009). In contrast, the BIV Rev protein NLS was shown to be of a classical type as it interacts with the α/β importin complex (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Despite the identification of the aa that compose the NLS of the FIV Rev protein, the import pathway of the FIV Rev protein in the nucleus remains unknown. Further experiments are thus needed to determine the NLS type of the FIV Rev protein.

As for the NLS, the NoLS identified in this study also has a monopartite structure. It is composed of the same residues that compose the NLS with the addition of residue K82 in its sequence. It has been shown that a threshold of six arginine/lysines is necessary for a peptide to accumulate into the cell nucleoli (Martin et al., 2015). This could explain why the mutation of only few residues within the NLS/NoLS was not sufficient to disrupt the nucleolar localization of the EGFP-FIV NLS WT protein (Fig 6). Interestingly, the FIV Rev protein NLS/NoLS contains the highest number of basic aa among lentiviral Rev proteins with a total

of 14 residues when compared to those of the HIV-1, EIAV, Bovine immunodeficiency virus (BIV) and Jembrana disease virus (JDV) Rev proteins (Table 1) (Gomez Corredor and Archambault, 2009; Kubota et al., 1989; Lee et al., 2006; Marchand et al., 2019). As such, the FIV Rev protein may be considered as unique among lentivirus Rev proteins.

Table 1. Identified NLS and NoLS sequences of various lentivirus Rev proteins

Lentivirus	Rev NLS sequence	References
HIV-1	³⁵ <u>RQARRN</u> RRRR <u>WRERQRQ</u> ⁵¹	Kubota et al., 1989
EIAV	¹⁵⁹ KRRRK ¹⁶³	Lee et al., 2006
JDV	⁷⁴ <u>RGR</u> RP <u>ARRPPIRR</u> HPSFWGTLRGLVSEA <u>QRRQ</u> ¹⁰⁵	Marchand et al., 2019
BIV	⁷¹ RARKLPGERR <u>PGFWKSLRELVEQN</u> RRKQERR ¹⁰¹	Gomez Corredor and Archambault, 2009
FIV	⁸² <u>KMKKKR</u> QRRRR <u>KKKAFKK</u> ⁹⁹	This study

The basic residues associated with NLS are in bold and the residues associated with NoLS are underlined. Amino acid positions in the protein sequence are indicated in superscript.

In summary, the results of this study demonstrated that the nucleolar and nuclear localization of the FIV Rev protein are mediated via overlapping NLS and NoLS motifs which differ from those found in other Rev and Rev-like proteins by the number of basic residues that compose these signals. Knowledge of the modes of action and variations among the lentiviral Rev proteins may help to better understand the replication and regulation process of the life replication of lentiviruses and may constitute the basis for the development of new drugs against lentiviruses.

3.6. Acknowledgments

C. Marchand was supported by a graduate studentship from the "Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologie" and partial support from the "Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal". This work was supported by an operating "Discovery" research grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPN-2016-06532) to D. Archambault.

Chapitre IV: Importation nucléaire et interaction au nucléole de la protéine Rev du JDV et du VIF

Dans les précédents chapitres, le domaine ARM contenant le NLS et le NoLS ainsi que le domaine riche en leucine contenant le NES ont été caractérisés pour la protéine Rev du JDV et partiellement pour le VIF. Le présent chapitre fait suite aux deux autres en présentant les résultats obtenus pour l'étude de la voie d'importation utilisée par les protéines Rev ainsi que dans l'étude des interactions de Rev avec certaines protéines abondantes du nucléole. Ces résultats pourront être soumis une fois que certains tests supplémentaires permettant de confirmer les données obtenues seront effectués. Toutefois, ces résultats permettent de mieux cerner les différences qui existent entre les protéines Rev des lentivirus.

4.1. Importation de Rev au noyau

Le CPN a un canal suffisamment large pour permettre la diffusion passive des protéines inférieures à 40 kDa (Davis, 1995). Des protéines de plus haut poids moléculaire peuvent toutefois traverser de façon passive, mais le temps nécessaire pour y arriver est plus important. Par exemple, une protéine comme la EGFP (environ 27 kDa) mettra quelques secondes pour traverser alors qu'une protéine d'environ 70 kDa prendra quelques minutes (Timney et al., 2016). Il est même possible pour des protéines de hauts poids moléculaires (plus de 200 kDa) de traverser le CPN de façon passive bien que le temps requis soit plus important, soit quelques heures (Popken et al., 2015). Cependant, la plupart des protéines ayant des fonctions dans le noyau utilisent un transport actif médié par des récepteurs. Dans ce cas, la translocation des protéines à travers le NPC nécessite des protéines porteuses et/ou des facteurs de transport différents. Le transport nucléo-cytoplasmique actif est assuré par les membres de la superfamille des karyophérines comprenant les importines et les exportines. Elles reconnaissent des signaux spécifiques généralement appelés signal de localisation nucléaire ou d'exportation nucléaire (NLS et NES respectivement). Les karyophérines peuvent

interagir avec ces séquences portées par la cargaison et assurer leur transport dans (NLS) ou en dehors (NES) du noyau (Davis, 1995).

Le NLS classique est généralement composé d'une courte séquence d'acides aminés basiques (monopartite) ou de deux segments séparés par une région de liaison courte de 10-12 acides aminés (bipartite) (Wagstaff and Jans, 2009). Les NLS monopartites et bipartites sont reconnues par un adaptateur appelé importine alpha ($IMP\alpha$ ou KPNA1-7). Après la reconnaissance de sa cargaison, l'importine α se lie à l'importine β 1 pour former le complexe cargaison-importin α - importine β 1 qui est ensuite transporté dans le noyau par le complexe de pores nucléaires. À l'intérieur du noyau, le complexe est dissocié par un processus de liaison d'une petite protéine G, Ran, dans sa forme liée au GTP, pour libérer les cargaisons (Cingolani et al., 1999).

Trois systèmes de récepteurs d'importation nucléaire ont été décrits, chacun d'entre eux facilitant l'importation d'un groupe distinct de protéines. Le premier est celui décrit ci-dessus impliquant l'importine α (qui lie le NLS) et l'importine β (qui médie la translocation) qui importe les protéines portant le motif classique du NLS (Görlich and Kutay, 1999). Le second consiste en un récepteur monomère, la transportine ou importine β 2. Elle intervient dans l'importation d'un groupe de protéines hétérogènes de liaison à l'ARN (hnRNPs) contenant un NLS riche en glycine et en acides aminés aromatiques (Nakielny et al., 1996). L'importation de protéines ribosomiques serait aussi médiée par des récepteurs monomères, appelés Kap123 et Pse1, apparentés à l'importine β (Rout et al., 1997).

Rev intervient dans l'exportation nucléaire des ARNs viraux partiellement épissés et non épissés. Les ARN partiellement épissés seront traduits pour former les protéines structurales pour l'assemblage des virions tandis que les ARN non épissés constitueront l'ARN génomique (Blissenbach et al., 2010). Pour remplir sa fonction, Rev fait la navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Il a été démontré que la protéine Rev du VIH-1 pénètre dans le noyau en utilisant divers récepteurs de transport, y compris la voie

d'importation dépendante de l'importine β sans la participation de l'importine α (Arnold et al., 2006), et de la transportine (Hutten et al., 2009). L'importation nucléaire de VIB Rev a également été étudiée et a montré une liaison directe de la protéine avec l'importine-3 et 5, mais pas avec l'importine β , contrairement au VIH-1 Rev (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Compte tenu des différentes voies d'importation utilisées par la protéine VIH-1 et VIB Rev et du fait que les séquences NLS de différentes protéines Revs soient divergentes, il est légitime de penser que ces protéines utilisent des voies d'importation différentes. Par conséquent, la voie d'importation de la protéine Rev du VIF et du JDV a été étudiée.

4.1.1. Méthodes

4.1.1.1. Culture cellulaire.

Les cellules HeLa et CrFK («Crandell feline kidney cells») ont été maintenues à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO₂ dans du milieu «Eagles's minimum essential medium» (EMEM) supplémenté avec du sérum de veau fœtal à 10% (Wisent). Les macrophages bovins (BoMac) (Stabel and Stabel 1995) ont été cultivés dans les mêmes conditions dans du milieu de culture «Roswell Park Memorial Institute» (RPMI) 1640 supplémenté avec du sérum de veau fœtal à 10% (Wisent).

4.1.1.2. Plasmides et constructions plasmidiques.

Les plasmides pGEX-3X codant pour la GST-importin $\alpha 1$ et la GST-importine β ont été donnés généreusement par le Dr Dongwan Yoo (Université de l'Illinois à Urbana-Champaign) (Mohammadi et al., 2009). Les plasmides codant pour la GST-importin $\alpha 3$ et $\alpha 5$ sont un généreux cadeau de Javier DiNoia (Institut de Recherche Clinique de Montréal, Canada) (Patenaude et al., 2009). Les plasmides codant pour les protéines VIH-1 et VIB EGFP Rev-His ont été décrits précédemment (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Pour générer les protéines Rev en fusion avec EGFP (à l'extrémité N-terminale de Rev) et un tag His₆ (à l'extrémité C-terminale de Rev), la séquence codant pour la protéine Rev du JDV a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pEGFP-JDVRevWT et la séquence codant pour la

protéine Rev du VIF à partir de pEGFP-VIFRevWT (les gènes ont été synthétisés et clonés dans le vecteur par Biobasic) en utilisant des amorces qui introduisent les sites de restriction EcoRI en 5' et XhoI en 3'. Les produits de PCR digérés ont ensuite été clonés dans pET-EGFP (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Afin de générer une version de Rev-His sans EGFP, les séquences codant pour Rev de chaque virus ont été clonées dans le vecteur pET21b+ entre les sites EcoRI et XhoI. Toutes les constructions contenant les gènes recombinants ont été validées par séquençage.

4.1.1.3. Purification des protéines recombinantes.

Les protéines Rev-His et EGFP Rev-His ont été exprimées dans des cellules bactériennes de la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta-gami B (DE3) pLysS (Novagen) après une induction de 4 h à 37°C en présence de 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Les culots bactériens ont été congelés à -80°C, dégelés sur glace puis resuspendus dans du tampon de lyse PE (G-Biosciences) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (cOmplete mini EDTA-free, Roche). Les cellules ont ensuite été traitées avec 1 mg/ml de lysozyme et 2.5 U de benzonase pour 20 min à température ambiante. Après la sonication, les lysats cellulaires ont été clarifiés par une centrifugation à 20 000 \times g à 4°C pendant 30 min. Les surnageants contenant la fraction soluble ont été équilibrés en ajoutant un volume égal de tampon de lavage (PBS contenant 30 mM imidazole, 300 mM NaCl, 6 mM β -mercaptoethanol et 0.4% de nonidet NP40) puis incubés avec la résine « Ni-charged Profinity IMAC » (Biorad) pendant 2 h à 4°C avec rotation. Après trois lavages avec le tampon de lavage, les protéines attachées à la résine ont été éluées avec le tampon d'éluion (PBS contenant 500 mM d'imidazole et 300 mM de NaCl) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (cOmplete mini EDTA-free, Roche).

Les protéines de fusion GST-importins α 1, α 3, α 5, et β ont été exprimées dans des cellules bactériennes de la souche *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) pLysS suite à une induction de 16 h à 30°C en présence de 0.5 mM d'IPTG. Les cellules bactériennes ont été traitées tel que décrit ci-haut à l'exception du tampon d'extraction qui était composé de 50 mM Tris et 150 mM NaCl, pH 8.0. Les lysats cellulaires ont été incubés avec la résine « Pierce

glutathione agarose » pendant 2 h à 4°C avec agitation. Après trois lavages avec le tampon d'extraction, les protéines attachées à la résine ont été éluées avec le tampon d'éluion (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0 contenant 50 mM de glutathione réduite) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (cOmplete mini EDTA-free, Roche).

L'albumine de sérum bovin (BSA) marquée avec le FITC et couplée au peptide contenant le NLS de l'antigène T du virus simien 40 (SV40) (BSA-NLS_{SV40}) a été achetée chez Genscript. Toutes les protéines décrites ci-haut ont été dialysées dans un tampon de transport (20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 110 mM acétate de potassium (KOAc), 2 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), et des inhibiteurs de protéases). Les protéines ont été conservées à -80°C pour une utilisation ultérieure sauf pour les protéines EGFP-Rev-His qui ont été utilisées fraîches pour chaque essai à cause de leur propension à former des agrégats suite au gel-dégel des protéines.

4.1.1.4. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE).

Afin de valider la pureté des protéines purifiées, 10 µl de protéines purifiées et dialysées ont été mélangées avec 2 µl de tampon de chargement 6x (375 mM Tris-HCl, 9% sodium dodécyl sulfate (SDS), 50% glycerol, 9% beta-mercaptoethanol et 0.03% bleu de bromophenol) et chauffées 5 min à 95°C. Le mélange a ensuite été déposé dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12% contenant du SDS. Le gel a ensuite été coloré au bleu de coomassie (0,25% Bleu Brillant G-250, 10% acide acétique dans un mélange méthanol: H₂O (1:1, v/v)) pendant 30 min puis décoloré dans une solution de décoloration (45% H₂O, 45% méthanol et 10% acide acétique) pendant 1 h avec agitation. Les résultats sont présentés à l'annexe B.2 (Figures B.2 et B.3).

4.1.1.5. Essai d'importation nucléaire *in vitro*.

L'essai d'importation nucléaire *in vitro* a été réalisé tel que décrit précédemment (Cassany and Gerace, 2009) avec quelques modifications. Les cellules HeLa

ont été cultivées sur des lamelles dans des plaques de douze puits jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 70%. Les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon de transport froid et perméabilisées avec de la digitonine (25 µg/ml) pendant 5 min sur glace. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec le tampon de transport. Les mélanges standards pour les réactions d'importation contenaient un système de régénération de l'ATP (1 mM ATP, 1 mM GTP, 5 mM phosphocréatine et 20 U/ml de créatine phosphokinase) comme source d'énergie, du lysat de réticulocytes de lapins (RRL) (25 µl) (Sigma) comme source de facteurs d'importation solubles, de la BSA non marquée (5 mg/ml) et 2 µM de substrat d'importation (EGFP-JDV Rev-His, EGFP-VIF Rev-His ou BSA-NLS_{SV40}) dans un volume final de 50 µl dans du tampon de transport. Aux endroits indiqués, les cellules perméabilisées ont été pré-incubées avec l'agglutinine de germe de blé (WGA) 30 min à température ambiante avec le tampon de transport contenant 0,8 mg/mL de WGA (Sigma-Aldrich) avant de procéder au test d'importation. Les cellules ont ensuite été incubées avec les différents mélanges d'importation pendant 30 min à 37°C ou 4°C. Après deux lavages avec le tampon de transport, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Les noyaux ont été colorés avec du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames en utilisant le réactif « ProLong gold antifade reagent » (Invitrogen).

4.1.1.6. Traitement avec l'importazole.

Les cellules BoMac (pour EGFP-JDV Rev NLS) et CrFK (pour EGFP-VIF Rev NLS et EGFP) ont étéensemencées sur des lamelles dans des plaques de 24 puits à une confluence d'environ 50%. Le jour suivant, 1 µg de plasmides codant pour EGFP en fusion avec le NLS de la protéine Rev du JDV ou du VIF a été mélangé avec le réactif de transfection Xtreme Gene 9 (Roche, Indianapolis, IN) et ajouté aux cellules selon le protocole du fabricant. Après 24 h, les cellules ont été laissées telles quelles ou ont été traitées avec 40 µM d'importazole pendant 5 h. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et fixées tel que décrit ci-haut.

4.1.1.7. Microscopie.

Les images ont été acquises par « confocal laser scanning microscopy » (CLSM) avec un microscope de fluorescence Eclipse Ti (Nikon) équipé d'un objectif de 60x. Le programme public ImageJ v1.62 a été utilisé afin de déterminer les ratios de fluorescence nucléaire/cytoplasmique (Fn/c). Ce ratio a été déterminé en utilisant la formule suivante : $F_n/c = (F_n - F_b)/(F_c - F_b)$, où F_n est la fluorescence nucléaire, F_c la fluorescence cytoplasmique et F_b la fluorescence du bruit de fond (autofluorescence). Les mesures ont été réalisées pour 10 cellules dans deux expérimentations indépendantes (n=20).

4.1.1.8. Essais d'interaction par ELISA.

Des plaques ELISA Immulon 2HB de 96 puits (Thermo Labsystems, Franklin, MA) ont été recouvertes avec 0.5 µg de protéines recombinantes Rev-His par puits diluées dans un tampon 0.05 M sodium carbonate (pH 9.6) toute la nuit à 4 °C. Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS contenant 0.05% v/v Tween 20 (PBST) puis bloqués avec du PBST contenant 1% de BSA à 37°C pendant 1 h. Les puits ont de nouveau été lavés avec du PBST puis ils ont été incubés avec la GST seule ou les protéines GST-importines diluées dans du PBST pendant 1 h à 37 °C. Après trois lavages au PBST, la plaque a été incubée pendant 2 h à 37 °C avec 100 µl d'une dilution 1/500 d'un anticorps monoclonal de souris anti-GST (Invitrogen) dans du PBST contenant 1% de BSA. Après trois autres lavages, la plaque a été incubée avec 100 µl d'un anticorps de lapin anti-souris couplé à la HRP (Invitrogen) dilué 1:2000 dans du PBST contenant 1% de BSA pendant 1 h à 37 °C. Après trois derniers lavages, 100 µl de substrat de la peroxydase (POD) ont été ajoutés dans chaque puits (Roche). L'absorbance à 450 nm a été mesurée avec un lecteur de microplaque. La densité optique (DO) a été corrigée en soustrayant la DO des puits contenant seulement la BSA.

4.1.1.9. Statistiques

Tous les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes ± l'erreur type. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme GraphPad Prism 7. À moins

d'indication contraire, les données ont été analysées en utilisant soit un test de t lorsque seulement deux moyennes ont été comparées, une ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Dunnett lorsque les moyennes ont été comparées à une moyenne « contrôle » ou une ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey lorsque plusieurs moyennes ont été comparées entre-elles.

4.1.2. Résultats

4.1.2.1. L'importation nucléaire de la protéine Rev du JDV et du VIF est dépendante de facteurs cytosoliques et du pore nucléaire.

Nous avons précédemment rapporté que le NLS de la protéine Rev du JDV est bipartite et celui du VIF est monopartite. Pour déterminer si ces NLS sont de type classique ou non, il est nécessaire d'identifier le mécanisme par lequel les protéines Rev du JDV et du VIF sont transportées dans le noyau. En premier lieu, un essai d'importation nucléaire utilisant des cellules HeLa perméabilisées avec de la digitonine a d'abord été réalisé afin de déterminer si le transport de Rev est passif ou actif et dépendant de facteurs cytosoliques. Les substrats d'importation utilisés dans ce test (EGFP-Rev-His) avaient une taille supérieure à 50 kDa. Par conséquent, ces protéines ne devraient pas diffuser passivement à travers le pore nucléaire de façon efficace puisque les protéines ayant une masse moléculaire supérieure à 40kDa sont normalement retenues dans le cytoplasme ou traversent très lentement cette barrière (Timney, Raveh et al. 2016). La protéine FITC-BSA-NLS_{SV40} présentant un poids moléculaire de 100 kDa a été utilisée comme témoin positif pour le transport actif et la voie classique d'importation (Cassany and Gerace, 2009). En présence du système complet d'importation (énergie + RRL) à 37°C, les protéines EGFP-FIVRev-His et BSA-NLS_{SV40} ont été observées en grande partie dans le noyau tel qu'indiqué à la figure 4.1. Les protéines EGFP-JDVRev-His ont été observées en moins grande proportion dans le noyau tel qu'observé dans des cellules transfectées (Figure 2.1).

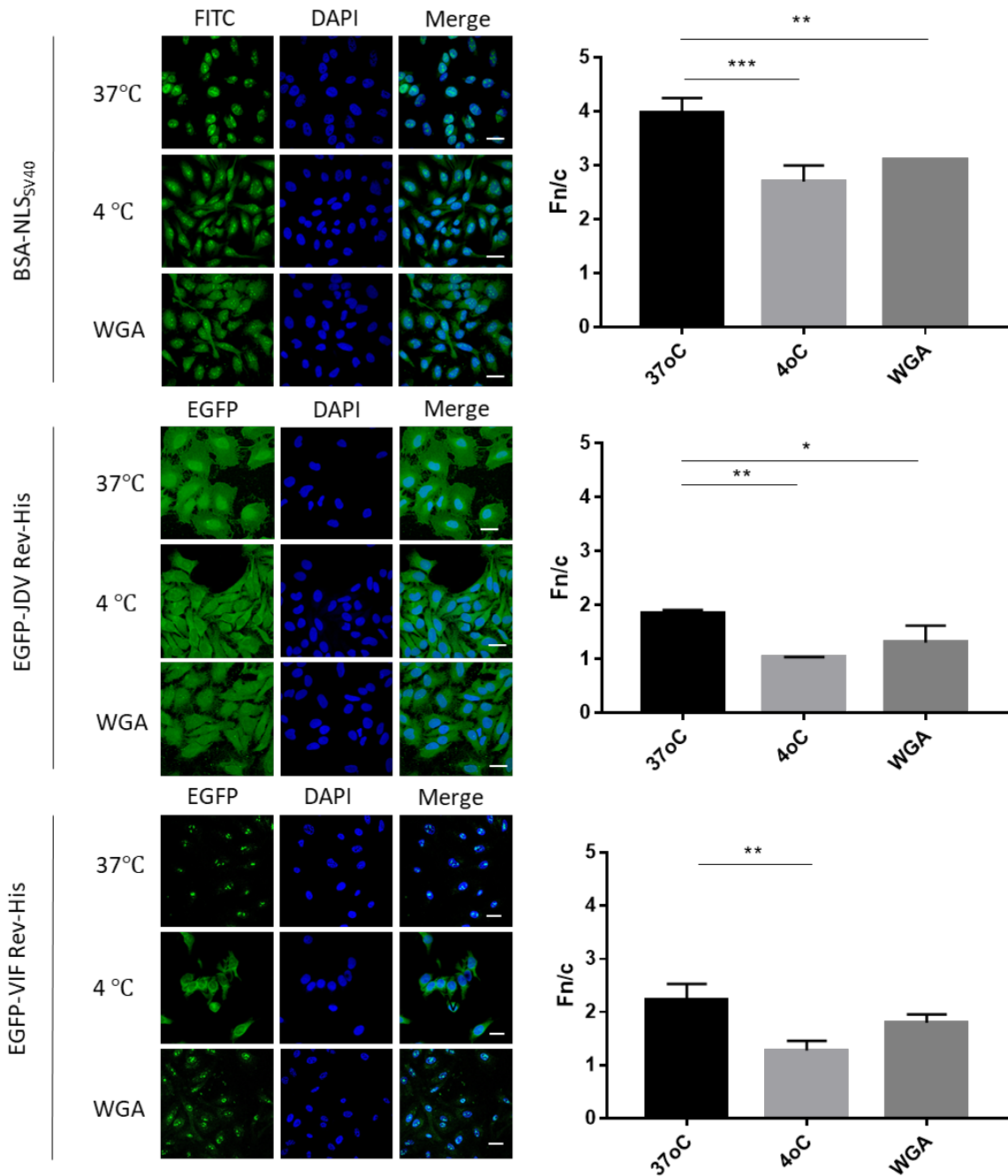


Figure 4.1. L'importation nucléaire des protéines EGFP-Rev-His du JDV et du VIF dans les cellules HeLa est un mécanisme actif dépendant de facteurs cytosoliques.

L'importation nucléaire de chacune des protéines EGFP-Rev-His et de BSA-NLS_{SV40} conjugué à FITC (vert) a été examinée en utilisant un test d'importation nucléaire *in vitro*. Des cellules HeLa perméabilisées à la digitonine ont été incubées à 4 ou 37 ° C avec 2 µM d'EGFP-Rev-His ou BSA-NLS_{SV40} dans 50 µl de tampon de transport contenant un système de régénération

de l'ATP et un lysat de réticulocytes de lapin pendant 30 min. Pour le traitement au WGA, les cellules perméabilisées ont été pré-incubées avec 0,8 mg / ml de WGA pendant 30 min à température ambiante dans du tampon de transport avant d'effectuer le test à 37°C. Les cellules ont été lavées avec du tampon de transport, puis fixées et les noyaux colorés avec du DAPI (bleu). Les cellules ont été visualisées par microscopie à fluorescence. Le panneau merge représente la superposition des images EGFP et DAPI. Les barres blanches représentent 20 µm. Les images obtenues par microscopie confocale à balayage laser ont été analysées afin de déterminer le ratio Fn/c (moyenne ± l'erreur type, pour $n = 50$). Les valeurs significativement différentes selon une analyse ANOVA suivi du test de Tukey sont indiqués par des astérisques: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ et ***, $P < 0.0005$.

Afin de déterminer si le transport nucléaire des protéines EGFP Rev-His du JDV et du VIF est dirigé par un transport actif, le même essai a été réalisé à 4°C. Cette température est reconnue pour inhiber le transport actif des protéines au noyau sans affecter la diffusion passive des plus petites molécules (Talcott and Moore, 1999). Tel qu'observé à la figure 4.1, l'accumulation nucléaire (Fn/c) de EGFP-Rev-His et du témoin étaient inférieure à 4°C à celle observée à 37°C suggérant du même coup une diminution de l'importation de Rev au noyau. Un résultat similaire a été obtenu lorsque l'essai d'importation a été réalisé en présence de WGA, un inhibiteur puissant du transport nucléaire actif des molécules (Mohr et al., 2009). Ensemble, ces résultats indiquent que l'importation nucléaire de la protéine EGFP-Rev-His du JDV et du VIF est effectuée activement à travers le NPC en interagissant avec des facteurs cytosoliques.

4.1.2.3. L'importation des protéines Rev du JDV et du VIF est dépendante de l'importine β .

Les protéines peuvent être activement transportées dans le noyau par leur liaison à plusieurs récepteurs d'importation, principalement l'importine β , directement ou indirectement par liaison avec l'importine α ou par d'autres récepteurs comme la transportine. La voie classique fait référence à la liaison de la cargaison contenant un NLS à l'importine α , qui à son tour lie l'importine β via son domaine IBB (Lange et al., 2007). Afin de déterminer si l'importation des protéines Rev du JDV et VIF dépend de l'importine β , les cellules exprimant EGFP-JDV Rev NLS ou EGFP-VIF Rev NLS ont été traitées avec l'importazole. Cette molécule peut bloquer spécifiquement l'importation nucléaire dépendant de l'importine β sans

affecter le transport nucléaire dirigé par la transportine et l'exportation nucléaire dirigée par Crm1 (Soderholm et al., 2011). Comme le montrent les figures 4.2A et B, l'accumulation nucléaire des différentes protéines EGFP-RevNLS a été efficacement réduite en présence d'importazole. Ainsi, les NLS identifiés pour ces deux protéines Rev semblent utiliser la voie de l'importine β pour se déplacer dans le noyau. Il est à noter que les protéines étaient encore observables dans le noyau en présence d'importazole. Ce résultat peut être en partie expliqué par la petite taille des protéines de fusion (environ 30 kDa) qui leur permet de diffuser de façon passive vers le noyau (Timney et al., 2016). L'utilisation d'une protéine de plus grande taille telle que la β -galactosidase serait pertinente ici. Il est aussi possible que la quantité d'importazole utilisée est insuffisante pour bloquer complètement l'importation ou que les protéines présentes dans le noyau y sont entrées avant le traitement et n'en sont pas sorties tout simplement comme elles ne contiennent pas de NES qui stimulerait leur exportation.

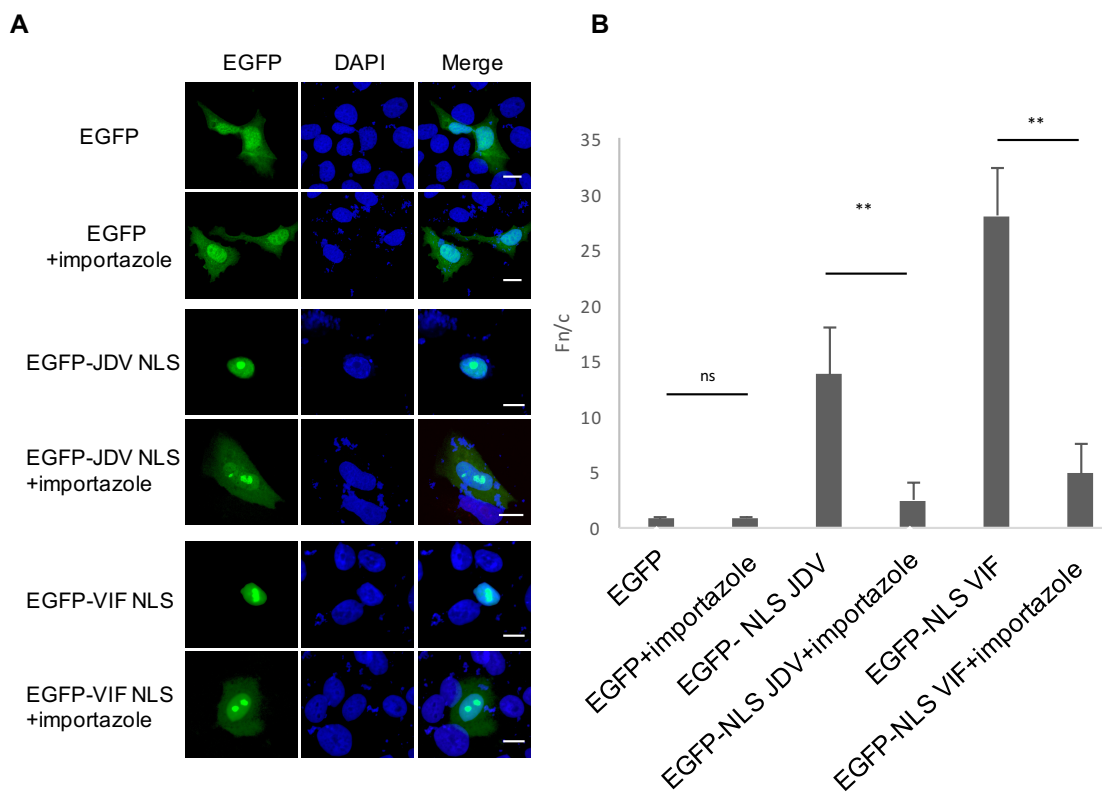


Figure 4.2. Le traitement à l'importazole réduit l'importation de la EGFP fusionnées à différent NLS de la protéines Rev de différents lentivirus.

(A) Analyse microscopique des protéines EGFP et EGFP-NLS (en vert). Des cellules BoMac (pour JDV) et CrFK (pour VIF Rev NLS et EGFP) ont été transfectées avec un plasmide codant pour EGFP fusionnée au NLS de la protéine Rev du JDV ou du VIF et incubées pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été laissées sans traitement ou traitées avec 40 nM d'importazole pendant 5 h. Les cellules ont été lavées avec du PBS, contre-colorées avec du DAPI pour la visualisation du noyau (bleu) et fixées. Le panneau merge représente la superposition des images EGFP ou EGFP-NLS et DAPI. Les barres blanches représentent 10 μ m. Les images présentées sont représentatives de l'expression observée dans les cellules provenant de deux expériences indépendantes. Les images ont été obtenues par microscopie confocale à balayage laser à un grossissement de 60x et analysées pour déterminer (B) les ratios F_n / c . Les résultats (moyenne \pm erreur type, pour $n=20$) sont indiqués pour EGFP et les différentes protéines EGFP-NLS. Les différences significatives entre les cellules non traitées et les cellules traitées avec importazole pour chaque NLS testée, déterminé par un test de t multiple, sont indiquées par ** ($P < 0,005$). ns : non significatif.

La même expérience a été menée avec les protéines Rev entières et non seulement leur NLS afin de confirmer les résultats ci-dessus dans le contexte de la protéine WT (Figure 4.3). Contrairement aux résultats obtenus avec le NLS, le traitement par importazole n'a pas altéré l'importation de EGFP-Rev du VIF. Ce résultat pourrait indiquer que des résidus en dehors de la séquence NLS pourraient être importants pour utiliser une autre voie d'importation indépendante de l'importine β . L'importation de la protéine Rev du VIH-1 était plus sévèrement altérée en présence d'importazole ce qui est en accord avec les résultats de la littérature qui ont montré que cette dernière se lie directement à l'importine β pour son importation (Arnold et al., 2006). Contrairement à la protéine Rev du VIF, la protéine Rev du JDV s'est avérée sensible au traitement à l'importazole bien que la différence fut moins importante que celle observée pour son NLS couplé à la EGFP. Les résultats indiquent donc que la protéine Rev du JDV utilise une voie d'importation impliquant l'importine β .

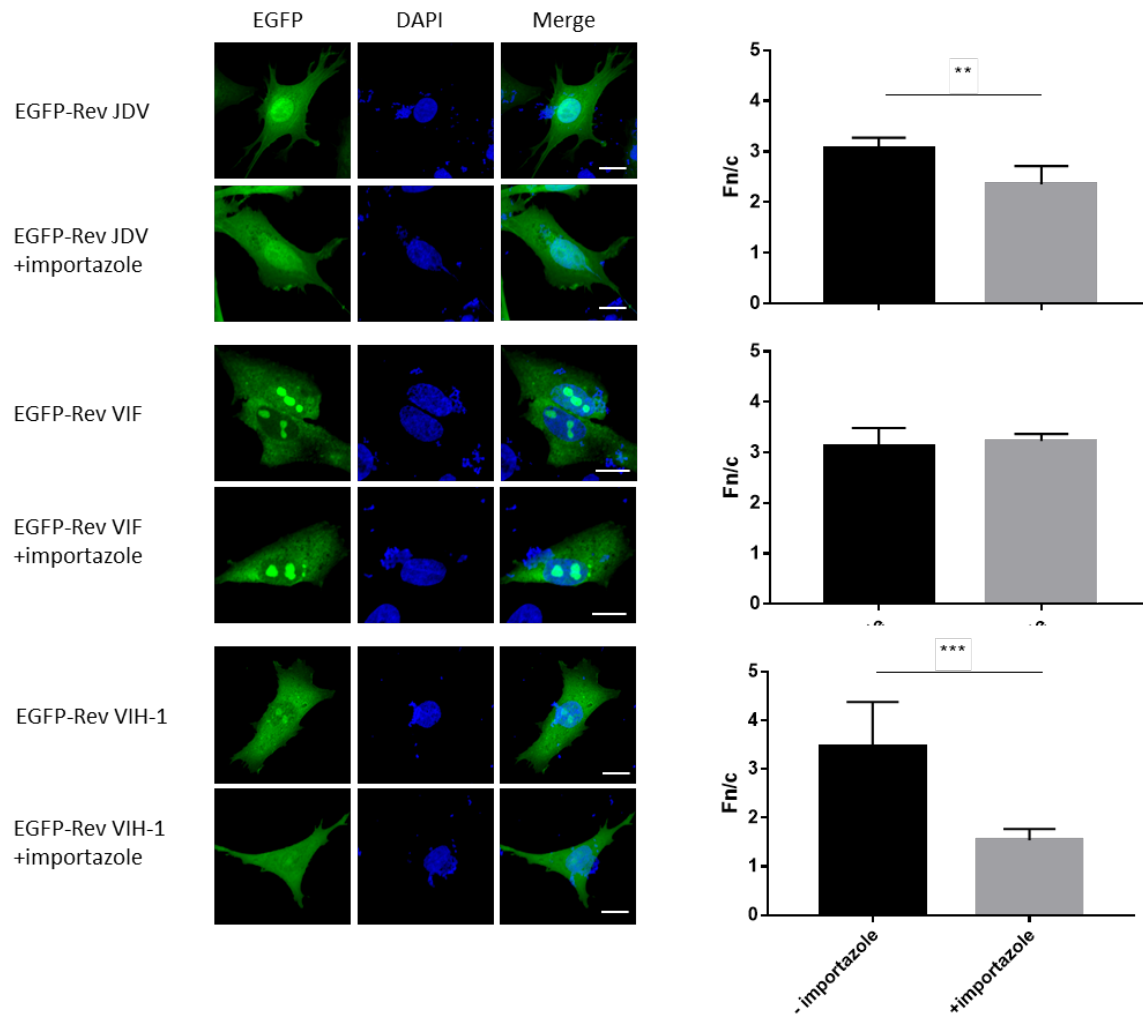


Figure 4.3. Traitement à l'importazole de cellules transfectées avec la protéine Rev en fusion avec EGFP.

Analyse microscopique de EGFP-Rev du VIH-1, JDV et VIF (en vert) (panneaux de gauche). Des cellules BoMac (pour JDV), HeLa (pour VIH-1) et CrFK (pour VIF) ont été transfectées avec un plasmide codant pour EGFP fusionnée à la protéine Rev du JDV, du VIF ou du VIH-1 et incubées pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été laissées sans traitement ou traitées avec 40 nM d'importazole pendant 5 h. Les cellules ont été lavées avec du PBS, contre-colorées avec du DAPI pour la visualisation du noyau (bleu) et fixées. Le panneau merge représente la superposition des images EGFP et DAPI. Les barres blanches représentent 10 μ m. Les images présentées sont représentatives des motifs d'expression observés dans les cellules de deux expériences indépendantes. Les images obtenues par microscopie à balayage laser à un grossissement de 60x ont été analysées pour déterminer les rapports Fn / c (panneaux de droite). Les résultats (moyenne \pm erreur type, pour n=20) sont indiqués pour toutes les EGFP-Revs. Les différences significatives entre les cellules non traitées et les cellules traitées avec l'importazole pour chaque protéine Rev déterminé par un test de T sont indiquées par ** (P < 0,005) et *** (P < 0,0005).

4.1.2.4. L'importation nucléaire de la protéine Rev du VIF ne repose pas sur une interaction directe avec l'importine $\beta 1$.

Les protéines Rev du VIH-1 et du VIB sont les seules protéines rétrovirales de type Rev / Rev-like pour lesquelles le mécanisme de l'importation nucléaire a été élucidé (Gomez Corredor and Archambault, 2012). La Rev du VIH-1 est transportée dans le noyau par sa liaison directe à plusieurs récepteurs d'importation, principalement l'importine $\beta 1$ ou la transportine (Arnold et al., 2006). Une étude antérieure a montré que le VIB était au contraire transporté dans le noyau par une interaction indirecte avec l'importine $\beta 1$ (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Pour déterminer si les protéines Rev du JDV et du VIF peuvent se lier directement à l'importine $\beta 1$, un test d'interaction protéine-protéine utilisant des protéines GST-importine- $\beta 1$ recombinantes purifiées a été réalisé en plaque à la façon d'un ELISA (Weng and Zhao, 2015; Ozgul et al., 2019). La BSA seule et la protéine VIB Rev-His (Gomez Corredor and Archambault, 2012) ont été utilisées comme témoins négatifs pour l'interaction avec l'importine $\beta 1$, tandis que la protéine Rev-His du VIH-1 a été utilisée comme témoin positif de l'interaction avec l'importine $\beta 1$ (Arnold et al., 2006). Comme le montre la figure 4.4, les valeurs de DO pour l'interaction entre l'importine $\beta 1$ -GST et les protéines Rev-His du VIB, du JDV et du VIF ou avec la BSA, n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues pour la protéine GST seule. Ces résultats indiquent que ces derniers n'interagissent pas directement avec l'importine- $\beta 1$. Cela suggère que la Rev de ces virus n'est pas importée par l'importine β seule et qu'un autre mécanisme d'importation nucléaire est impliqué. En revanche, la DO mesurée était significativement plus élevée pour les protéines EGFP-Rev-His du VIH-1 en présence de l'importine $\beta 1$ -GST que pour la GST seule. Ce résultat valide les résultats obtenus dans la littérature pour la protéine Rev du VIH-1 qui est déjà connue pour se lier directement avec cette importine.

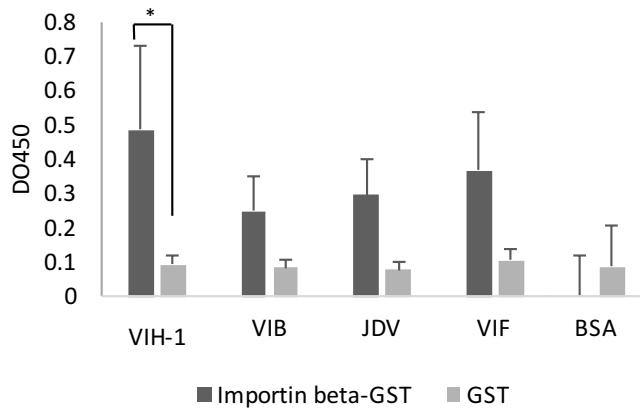


Figure 4.4. Interaction directe de Rev avec l'importine β 1.

Les puits d'une plaque ELISA ont été recouverts de protéines recombinantes Rev-His pendant une nuit à 4 ° C, puis bloqués dans du PBST contenant 1% de BSA à 37 ° C pendant 1 heure. Après des lavages avec du PBST, la GST seule ou des protéines GST-importine- β 1 diluées dans du PBST ont été ajoutées pendant 1 heure à 37 ° C. L'interaction a été détectée avec 100 μ l d'une dilution 1/500 d'un anticorps monoclonal de souris anti-GST pendant 2 heures à 37 ° C suivi d'un anticorps monoclonal de lapin anti-souris conjugué à la HRP dilué 1/2000 dans du PBST contenant 1% de BSA pendant 1 heure à 37 ° C. La plaque a été lavée trois fois de plus avant l'addition du substrat de la peroxydase. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en DO \pm erreur type pour n = 8 provenant de deux expériences indépendantes. Les différences significatives entre les puits avec la protéine GST et ceux contenant l'importin β 1-GST pour chaque protéine Rev déterminé par un test de T multiple sont indiquées par * (P <0,05).

4.1.2.5. Les protéines Rev de différents lentivirus peuvent interagir avec les importines α des trois sous-familles.

Certaines des protéines Rev étudiées n'étant pas capables de se lier à l'importine β , leur capacité à se lier à différentes sous-familles d'importine α a été évaluée. Pour ce faire, un test d'interaction protéine-protéine similaire au test ci-dessus a été réalisé en utilisant des protéines GST-importine α de chaque sous-famille. La GST seule a été utilisée comme témoin négatif. Comme le montre la figure 4.5, les valeurs de DO pour l'interaction entre les protéines importine et les protéines Rev-His étaient toutes significativement supérieures à celles obtenues pour la protéine GST seule. Ces résultats ont montré que la protéine Rev de divers lentivirus est capable d'interagir avec toutes les importines α testées. De plus, toutes les

protéines Rev interagissent à des niveaux similaires avec les différentes importines α , à l'exception de l'importine α -1-GST pour la protéine Rev du VIH-1 et du VIB dont l'interaction est légèrement inférieure. Cependant, des expériences ultérieures sont nécessaires pour déterminer si ces interactions sont nécessaires et propices à l'importation nucléaire de Rev. Il est possible qu'une interaction soit observée, mais que l'importine ne soit pas en mesure pour autant d'assurer le transport de Rev au noyau.

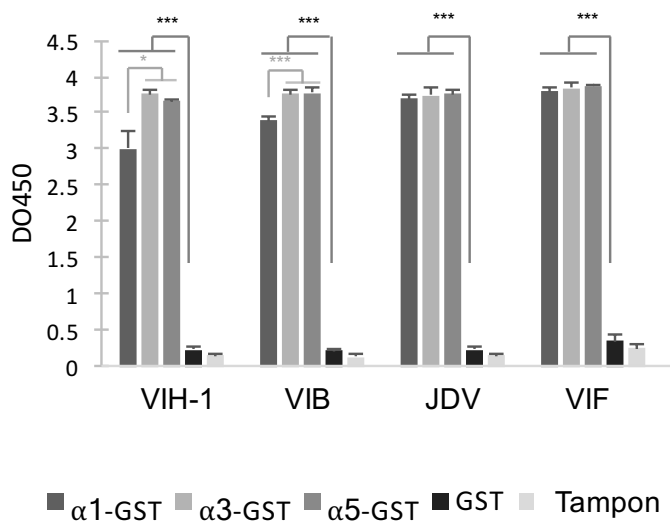


Figure 4.5. Interaction directe de Rev avec différentes importines α .

Les puits d'une plaque ELISA ont été recouverts de protéines recombinantes Rev-His pendant une nuit à 4 ° C, puis bloqués dans du PBST contenant 1% de BSA à 37 ° C pendant 1 heure. Après des lavages avec du PBST, la GST seule ou des protéines GST-importine- α diluées dans du PBS-T ont été ajoutées pendant 1 heure à 37 ° C. L'interaction a été détectée avec 100 μ l d'une dilution 1/500 d'un anticorps monoclonal de souris anti-GST pendant 2 heures à 37 ° C suivi d'un anticorps monoclonal de lapin anti-souris conjugué à la HRP dilué 1/2000 dans du PBST contenant 1% de BSA pendant 1 heure à 37 ° C. La plaque a été lavée trois fois de plus avant l'addition du substrat de la peroxydase. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en DO \pm erreur type pour n = 8 provenant de deux expériences indépendantes. Les différences significatives entre les puits avec la protéine GST et ceux contenant l'importine α -GST pour chaque protéine Rev déterminé par une ANOVA suivi du test de Tukey sont indiquées par * ($P < 0,05$) et *** ($P < 0.0005$).

4.2. Partenaires d'interaction nucléolaires

Au cours des dernières années, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus au nucléole. Une majorité des virus, si ce ne sont pas tous, possèdent au moins une protéine qui se localise dans le nucléole (Salveti and Greco, 2014). Pour plusieurs de ces protéines, cette localisation dépendante d'interaction avec les protéines nucléolaires est bénéfique voire essentielle à la réplication virale. Comme toutes les protéines Rev étudiées ont montré une forte tendance à s'accumuler dans le nucléole, des expériences permettant d'étudier l'interaction entre des protéines ont été réalisées afin de déterminer laquelle ou lesquelles des principales protéines qui composent le nucléole peuvent interagir directement ou indirectement avec la protéine Rev et favorisent ainsi sa rétention au nucléole.

4.2.1. Méthodes

4.2.1.1. Production et purification des protéines Rev-GST.

Les séquences codant pour les protéines Rev du VIB, du VIH-1, du JDV et du VIF ont été insérées dans le vecteur pGex4T1 entre les sites de restrictions EcoRI et XhoI. Les protéines Rev-GST ont été exprimées dans des cellules bactériennes de la souche *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3)pLysS (Novagen) après une induction de 4 h à 37°C en présence de 1 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Les culots bactériens ont été congelés à -80°C, dégelés sur glace puis resuspendus dans du tampon de lyse PE (G-Biosciences) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules ont ensuite été traitées avec 1 mg/ml de lysozyme et 2.5 U de benzonase pour 20 min à température ambiante. Après la sonication, les lysats cellulaires ont été clarifiés par une centrifugation à 20 000 × g à 4°C pendant 30 min. Les surnageants contenant la fraction soluble ont été équilibrés en ajoutant un volume égal de tampon de lavage (50 mM Tris et 150 mM NaCl, pH 8.0). Les lysats cellulaires ont été incubés avec la résine « Pierce glutathione agarose » pendant 2 h à 4°C avec agitation. Après 3 lavages avec le tampon de lavage, les protéines attachées à la résine ont été éluées avec le tampon d'éluion (50 mM Tris, 150 mM

NaCl, pH 8.0 contenant 50 mM de glutathione réduite) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases. Les protéines ont ensuite été dialysées dans du PBS, aliquotées puis congelées à -80°C.

4.2.1.2. Extraction des nucléoles.

L'extraction a été réalisée telle que décrite précédemment (Lam and Lamond 2006) avec quelques petites modifications. Des cellules HEK 293T (VIH-1), CrFK (VIF) ou BoMac (JDV et VIB) ont été cultivées dans des pétris de 15 cm. Lorsque les cellules étaient confluentes, elles ont été lavées avec du PBS puis décollées à l'aide de grattoirs et centrifugées à 218 x g pendant 5 min à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 5 ml de tampon A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, pH 7.9) puis laissés sur glace pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été lysées en utilisant un homogénéisateur Dounce puis centrifugées à 218 x g pendant 5 min à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 3 ml du tampon S1 (0.25 M sucrose, 10 mM MgCl₂) puis déposés sur 3 ml du tampon S2 (0.35 M sucrose, 0.5 mM MgCl₂). Le gradient a été centrifugé à 1 430 x g pendant 5 min à 4°C. Les culots contenant maintenant les noyaux propres ont été resuspendus dans 3 ml du tampon S2. Les noyaux ont été brisés par sonication (entre 6 et 10 x 10 sec avec 10 sec de pause entre chaque), puis ont été déposés sur 3 ml du tampon S3 (0.88 M sucrose, 0.5 mM MgCl₂) avant d'être centrifugés à 3 000 x g pendant 10 min à 4°C. Les nucléoles présents dans le culot ont été resuspendus dans 0,5 mL du tampon S2 et conservés à -80°C. La qualité des extraits a été vérifiée par observation au microscope (Annexe B3, Figure B4).

4.2.1.3. Essais d'interaction par ELISA.

Des plaques ELISA Immulon 2HB de 96 puits (Thermo LabSystems, Franklin, MA) ont été recouvertes avec 0,5 µg de protéines recombinantes Rev-GST par puits diluées dans un tampon 0.05 M sodium carbonate (pH 9.6) toute la nuit à 4 °C. Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS contenant 0.05% v/v Tween 20 (PBST) puis bloqués avec du PBST contenant 1% de BSA à 37°C pendant 1 h. Les puits ont de nouveau été lavés avec du PBST puis ils ont

été incubés avec 100 µl d'extrait nucléolaire dilués dans du PBS ou avec du PBS seulement pendant 1 h à 37 °C. Après trois lavages au PBST, la plaque a été incubée pendant 2 h à 37 °C avec 100 µl d'une dilution 1/500 d'un anticorps monoclonal de souris anti-B23 ou anti-fibrillarine (Abcam) ou un anticorps polyclonal de lapin anti-nucléoline (Santacruz Biotechnologies) dans du PBST contenant 1% de BSA. Après trois nouveaux lavages, la plaque a été incubée avec 100 µl d'un anticorps de lapin anti-souris (B23 et fibrillarine) ou de chèvre anti-lapin (nucléoline) couplé à la HRP (Invitrogen) dilué 1:2000 dans du PBST contenant 1% de BSA pendant 1 h à 37 °C. Après 3 derniers lavages, 100 µl de substrat de la peroxydase (POD) ont été ajoutés dans chaque puits (Roche). L'absorbance à 450 nm a été mesurée avec un lecteur de microplaque.

4.2.1.4. Coimmunoprécipitation

Des cellules CrFK (pour le VIF) et BoMac (pour le JDV) ont été cultivées dans des plaques de culture de 6 puits puis transfectées avec les plasmides codant pour EGFP, EGFP-Rev FIV ou EGFP-Rev JDV. Les cellules ont ensuite été lavées et lysées par la méthode REAP (Rapid, Efficient And Practical) (Suzuki et al., 2010). Il s'agit d'une méthode de séparation des fractions cytosoliques et nucléaires en seulement deux minutes avec un excellent rendement. Les lysats ont été incubés pendant 1 heure avec les microbilles µMACS™ Anti-GFP (Miltenyi Biotec) sur la glace. Après l'incubation, le mélange a été appliqué sur la colonne placée dans le champ magnétique. Les premiers lavages ont été effectués avec le tampon de lyse. Le dernier lavage et l'élution ont été effectués conformément aux instructions du fabricant. Les éluions et les contrôles de chargement (10% du lysat total) ont été analysés par immunobuvargage de type Western avec les anticorps appropriés.

4.2.2. Résultats

4.2.2.2. Les protéines Rev de différents lentivirus interagissent avec la protéine B23.

En utilisant un test ELISA, l'interaction entre Rev et des protéines du nucléole a pu être analysée. Il avait déjà été montré dans d'autres études que la protéine Rev du VIH-1 et

celle du VIB pouvait interagir avec la protéine B23 et que l'altération de cette interaction avait pour conséquence de réduire la réplication de ces virus (Nouri et al., 2015; Passos-Castilho et al., 2018). Cette interaction a donc été vérifiée pour les autres protéines Rev en utilisant dans un premier temps le test ELISA. Les protéines Rev ont été fixées dans les plaques puis incubées avec un extrait nucléolaire. Les protéines du nucléole accrochées aux protéines Rev ont été détectées avec des anticorps appropriés. Selon les résultats obtenus, toutes les protéines Rev ont montré une interaction avec la protéine B23 (Fig. 4.6A). Aucun résultat significatif n'a été observé pour la nucléoline et la fibrillarine (Fig. 4.6B et C respectivement) à part un faible signal pour la protéine Rev du VIF et la nucléoline. Outre le fait qu'il n'y a possiblement pas d'interaction, il est possible que pour la nucléoline et la fibrillarine l'épitope reconnu par l'anticorps soit masqué ou peu accessible suite à l'interaction des deux protéines. D'autres anticorps devraient être testés. Ces deux protéines sont aussi moins abondantes que la protéine B23 dans le nucléole. Par conséquent, il serait peut-être plus judicieux dans leur cas de les immobiliser au fond des plaques avec leur anticorps respectif avant d'ajouter de la protéine Rev-GST purifiée suivi d'un anticorps anti-GST.

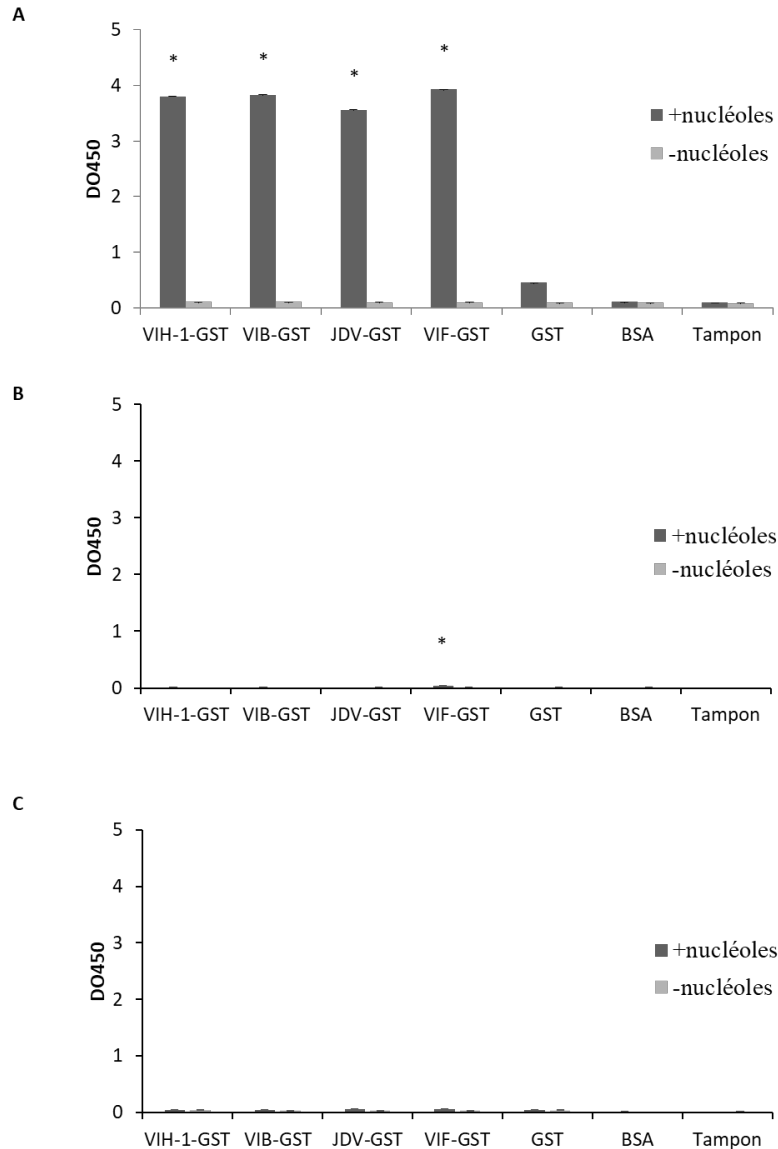


Figure 4.6. Interaction entre les protéines Rev de différents lentivirus fusionnées à la GST et les principales protéines du nucléole.

Les puits d'une plaque ELISA ont été recouverts de protéines recombinantes Rev-GST ou GST seule pendant une nuit à 4 ° C, puis bloqués dans du PBST contenant 1% de BSA à 37 ° C pendant 1 heure. Après des lavages avec du PBST, 100 µl d'extrait nucléolaire dilués dans du PBS ou seulement du PBS ont été ajoutés pendant 1 heure à 37 ° C. L'interaction a été détectée avec 100 µl d'une dilution 1/500 d'un anticorps (A) monoclonal de souris anti-B23, (B) polyclonal de lapin anti-nucléoline ou (C) monoclonal de souris anti-fibrillarine pendant 2 heures à 37 ° C. Après trois autres lavages, un anticorps monoclonal de lapin anti-souris (pour B23 et fibrillarine) ou un anticorps de chèvre anti-lapin (pour nucléoline) conjugué à la HRP dilué 1/2000 dans du PBST contenant 1% de BSA a été ajouté aux puits et incubé pendant 1 heure à 37 ° C. La plaque a été lavée trois fois de plus avant l'addition du substrat de la

peroxydase. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en DO \pm erreur type pour n = 4 (duplicatas de deux expériences indépendantes). Les différences significatives entre la GST seule et les constructions Rev-GST, déterminées par une ANOVA suivi du test de Dunnett, sont indiquées par * (P <0,05).

Les résultats ont été confirmés pour la protéine Rev du JDV et du VIF par un test de coimmunoprécipitation (Fig. 4.7). Pour la nucléoline, seule la protéine Rev du VIF a montré une interaction en étant précipitée avec Rev. Bien que la densité optique obtenue pour le test en plaque fut très faible pour la nucléoline, les résultats des deux tests sont cohérents. Les résultats obtenus pour B23 confirment ceux obtenus avec l'essai en plaque pour le JDV et le VIF puisque la protéine B23 a été précipitée en même temps que la protéine Rev. Pour la fibrillarine, les résultats étaient tous négatifs (données non montrées).

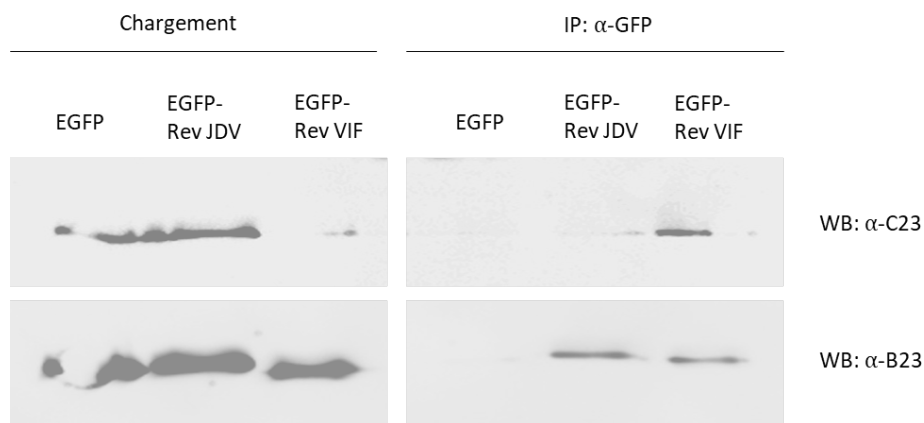


Figure 4.7. Coimmunoprécipitation des protéines Rev du JDV et du VIF avec les principales protéines du nucléole.

Des cellules CrFK (pour le VIF) et BoMac (pour le JDV) ont été transfectées avec les plasmides codant pour EGFP, EGFP-Rev FIV ou EGFP-Rev JDV. Les cellules ont ensuite été lysées puis incubées avec des microbilles magnétiques anti-GFP. Les éluions et les témoins de chargement (input, 10% du lysat total) ont été analysés par immunobuvardage de type Western avec les anticorps anti-B23 et anti-C23 (nucléoline).

Chapitre V: Discussion générale

Les protéines Rev et Rev-like des rétrovirus sont des protéines régulatrices essentielles pour la réplication virale. Elles sont responsables principalement de l'exportation nucléaire des ARN viraux partiellement et non épissés. Afin d'exercer leur activité, les protéines Rev des lentivirus doivent entrer dans le noyau, former des multimères, lier le RRE des ARN viraux avant qu'ils ne soient complètement épissés et doivent permettre l'exportation du complexe ainsi formé vers le cytoplasme pour assurer la réplication du virus. Il faut donc que la protéine Rev possède des domaines fonctionnels qui lui permettent d'accomplir toutes ces étapes. La protéine Rev du VIH-1 possède en effet un signal de localisation nucléaire/nucléolaire qui lui permet d'être importée dans le noyau, un domaine de liaison à l'ARN lui permettant de lier le RRE des ARN viraux non épissés, un domaine de multimérisation favorisant l'assemblage de plusieurs Rev sur le RRE et un domaine d'activation qui contient un signal d'exportation nucléaire permettant au complexe d'être exporté. Ces domaines ont été identifiés pour la protéine Rev du VIH-1, du VIB et du VAIE principalement. Pour les autres lentivirus, peu d'entre eux ont été identifiés et la majorité ne sont que prédits par homologie avec les protéines Rev déjà caractérisées. Par conséquent, les domaines fonctionnels des protéines Rev du JDV et du VIF ont été principalement étudiés dans cette thèse.

5.1. Le motif riche en arginine (ARM)

Chez la protéine Rev, le motif riche en arginine porte son nom de par sa richesse en acides aminés arginine pour le VIH-1 qui a été décrit en premier. Cependant, pour les autres Rev, cette séquence peut aussi être riche en lysine qui est aussi un résidu basique et donc chargé positivement. Cette région est connue pour contenir le NLS et le NoLS, si ce dernier est présent, ainsi que le domaine de liaison à l'ARN qui chevauche normalement le NLS.

5.1.1. Le NLS/NoLS

Les sites de liaison sur la surface de la karyophérine α , spécialisée dans la reconnaissance de NLS classiques, combinent des éléments hydrophobes et électrostatiques d'une manière qui convient uniquement à la reconnaissance de la lysine et de l'arginine. L'étude cristallographique de l'importine α liée à divers NLS a permis d'établir que cette dernière porte deux domaines de liaison. Le premier site de liaison, le plus grand, est structuré de manière optimale pour la reconnaissance de cinq résidus lysine ou arginine, tandis que le site de liaison plus petit permet une reconnaissance spécifique de deux résidus basiques (Conti et al., 1998). La région d'espacement entre ces deux motifs doit être de 10 résidus au minimum (Robbins et al., 1991) sans quoi l'interaction simultanée des deux régions ne peut avoir lieu (Conti et al., 1998; Lange et al., 2010). Au chapitre 2 du présent travail, le NLS du JDV a été identifié comme étant monopartite et composé des résidus 76-RRPARRPPIRR-86. Cette séquence permettrait en théorie l'interaction de la protéine au premier site de liaison de l'importine α . Les résidus R103 et R104 n'ont pu être identifiés comme importants pour le transport nucléaire de Rev avec les expériences réalisées. Il aurait fallu réaliser une expérience supplémentaire dans laquelle les différentes séquences mutantes du NLS auraient été fusionnées à une protéine de haut poids moléculaire telle que la β -galactosidase pour prévenir la diffusion passive de la protéine. De plus, des essais de pull-down avec l'importine α et les différents mutants du NLS pourraient être réalisés afin d'évaluer l'importance de ces résidus pour une interaction efficace avec l'importine α (Zienkiewicz, Armitage and Hawiger, 2013). Il reste donc possible que ces résidus soient importants pour une liaison efficace avec l'importine α . Le NLS du JDV étant composé d'une première séquence de 6 arginines et potentiellement d'une seconde séquence portant deux autres arginines, il convient en théorie parfaitement à la liaison avec l'importine α (Tableau 5.1).

Pour les NLS bipartites, la séquence en C-terminal (deuxième regroupement) agit souvent comme un NLS monopartite et est suffisante pour permettre la localisation nucléaire de la protéine qui la porte (Robbins et al., 1991; Kosugi et al., 2009). C'est ce qui est observé pour la protéine Rev du VIB dont le NLS est aussi bipartite. La présence de la portion en C-

terminal du NLS est suffisante pour permettre une certaine localisation nucléaire (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Advenant la participation des résidus R103 et R104 dans l'interaction avec l'importine α , et donc la présence d'un NLS bipartite, c'est le phénomène inverse qui serait observé. C'est le regroupement en N-terminal du NLS qui pourrait à lui seul permettre à la protéine de se localiser dans le noyau. Cependant, la capacité du NLS de la protéine Rev du JDV à lier l'importine α n'a pas semblé être diminuée par rapport aux autres protéines dans les tests effectués. L'impact d'une telle organisation sur la liaison à l'importine α n'est pas connue.

En ce qui concerne le NLS du VIF, étudié au chapitre 3, celui-ci s'est avéré être de type monopartite et est composé d'arginines et d'un grand nombre de lysines. Il s'apparente donc davantage à celui du VIH-1. Par contre, selon les résultats préliminaires présentés dans cette thèse, le VIF ne semble pas pouvoir interagir directement avec l'importine β ce qui suggère que leur NLS n'est pas reconnu par les mêmes récepteurs d'importation. Bien sûr, des tests d'importation *in vitro* devront être réalisés afin de confirmer ces résultats

Tableau 5.1. Séquence NLS et NoLS dans les protéines Rev de Lentivirus

Protéine ¹	NLS/NoLS ²	Référence
Rev VIH-1	RQARRN RRRR WRERQRO	Kubota et al., 1989
Rev VAIE	KRRRK	Lee et al., 2006
Rev VIB	RARKLPGERRPGFWKSLRELVEQNRRKQERR	Gomez et al., 2009
Rev JDV	RGRRPARRPPIRR HPSFWGTLRGLVSEAQRRQ	Cette étude (chap 2)
Rev VIF	KMKKKRQRRRRKKKAFKK	Cette étude (chap 3)

¹Abréviations : VIH-1, virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ; VAIE, virus de l'anémie infectieuse équine ; VIB, virus de l'immunodéficience bovine ; JDV, Jembrana disease virus ; VIF, virus de l'immunodéficience féline; VAEC, virus de l'arthrite-encéphalite caprine.

²Les résidus basiques associés au NLS sont en gras alors que les résidus associés au NoLS sont soulignés.

5.1.2. Le domaine de liaison à l'ARN (RBD)

Le domaine de liaison à l'ARN est aussi riche en résidus basiques. En effet, les résidus arginine et lysine confèrent une charge nette positive à la séquence favorisant ainsi les interactions avec l'ARN chargé négativement à cause des groupements phosphates. Le domaine du RBD est généralement plus étendu que celui du NLS. La raison de cette disposition est bien simple. Dans le noyau, Rev lie le RRE des ARN viraux via son RBD ce qui a pour conséquence de masquer son NLS. Le complexe est ensuite transporté vers le cytoplasme. Dans le cas où le NLS ne serait pas masqué, le complexe pourrait être transporté de nouveau dans le noyau et l'ARN serait alors épissé. En masquant de la sorte le NLS, tant que le complexe n'est pas dissocié, il ne peut être réimporté dans le noyau (Fineberg et al., 2003).

La protéine Rev du VIH-1 possède un RBD qui correspond exactement aux résidus qui composent son NLS en plus des résidus R48 et R50 et est donc monopartite (Böhnlein et al., 1991; Casu et al., 2013). Les autres RBD décrits jusqu'à maintenant pour les protéines Rev sont bipartites. Le RBD de la protéine Rev du virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE) est composé des résidus du NLS (159-KRRRK-163) ainsi que d'une petite séquence basique composée des acides aminés 76-RRDRW-80 (Lee et al., 2006). Tel qu'identifié dans notre laboratoire, le RBD du VIB est aussi composé des résidus du NLS en plus des acides aminés R107-R108 en aval du NLS et des acides aminés 154-KLKR-157 près de l'extrémité C-terminale (Gomez Corredor et al., 2017). Finalement, pour le virus de l'arthrite-encéphalite caprin (VAEC), la séquence basique du NLS est importante en plus des résidus 25-KERKR-29 situés dans le domaine N-terminal de la protéine (Schoborg and Clements, 1996; Abelson and Schoborg, 2003). Le RBD n'a pas été caractérisé précisément pour le virus Meadi-Visna (VMV), mais il serait minimalement composé de la séquence basique formant le NLS (Schoborg and Clements, 1996). De plus, une séquence en C-terminal composée des acides aminés 149-KEKRRK-153 ressemblant fortement à celle en N-terminal qui compose le RBD du VAEC pourrait être impliquée. Pour le JDV, les expériences réalisées dans la présente étude ont permis d'identifier les résidus du domaine basique 74-RGRRPARRPPIRR-86 et R103-R104 comme faisant partie du RBD puisque les mutations simples des résidus basiques de

cette séquence n'ont pas affecté significativement la localisation de la protéine alors qu'une baisse de l'activité d'exportation a pu être observée bien que parfois non significative.

En bref, l'objectif était de localiser et caractériser le NLS et le NoLS de la protéine Rev du JDV et du VIF ce qui a été accompli avec succès. Des NLS/NoLS monopartites ont été identifiés pour chaque virus avec des séquences différentes l'une de l'autre et de celles déjà connues pour Rev. Au passage, il a été possible d'identifier partiellement les résidus formant le RBD du JDV et du VIF. Ces domaines se sont avérés être bipartites en contraste avec le RBD monopartite de la protéine Rev du VIH-1. L'utilisation de mutants supplémentaires dans des tests similaires permettra d'identifier avec plus de précision le RBD. Ces domaines sont essentiels pour la fonction de Rev et par conséquent représentent des cibles anti-virales de choix.

5.2. Le NES ou domaine effecteur

Toutes les protéines Rev caractérisées jusqu'à maintenant possèdent un signal d'exportation nécessaire à sa fonction de transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme (Sahasini and Reddy, 2009) et la protéine Rev du JDV ne fait pas exception. La région et la composition exacte des résidus qui forment le NES ont été déterminées dans le chapitre II de cette thèse. Le NES des protéines exportées par l'exportine Crm1 est généralement composé de 4 à 5 résidus de type hydrophobe, principalement des leucines. Par contre des isoleucines, valines, méthionines ou phénylalanines peuvent aussi occuper ces positions (Güttler et al., 2010). Les NES sont classés en fonction du nombre de résidus qui séparent les acides aminés hydrophobes qui forment cette séquence. La classification la plus répandue est celle comprenant la classe PKI et la classe Rev du VIH-1 puisque ces NES ont été caractérisés en premier. Toutefois, des études récentes ont tenté d'augmenter le nombre de consensus et donc de classes pour y mettre tous les NES caractérisés, ce qui fut impossible. La

conclusion est que les NES interagissant avec Crm1 devraient être classés en fonction de leur conformation plutôt que leur séquence (Fung et al., 2017).

Le NES de la protéine Rev du VIH-1 se démarque des autres non seulement par la séquence d'espacement entre ces résidus, mais surtout par sa conformation déstructurée causée par la présence élevée de résidus proline (Güttler et al., 2010). La structure prédite des autres NES caractérisés ici est en hélice et s'apparente davantage à la conformation du NES de type PKI (Annexes G et H). D'ailleurs, le NES de Rev du JDV possède une séquence qui correspond à cette classe et les résidus qui le composent sont « optimaux » si l'on se base sur une étude effectuée par Güttler et son équipe (2010). L'organisation des résidus et la composition correspondant à la séquence optimale pour l'exportation de la PKI (Tableau 5.2) pourraient favoriser une exportation plus efficace de la protéine Rev et expliquer en partie les niveaux élevés de virions retrouvés lors d'une infection par le JDV. De plus, la présence de résidus chargés négativement entre les résidus hydrophobes contribue aussi à l'efficacité du NES (Xu et al., 2012). Le NES du JDV en compte cinq alors que la séquence NES du PKI en compte seulement 2. Il serait intéressant d'interchanger les NES de la protéine Rev du VIH-1 et du JDV afin de comparer leur activité d'exportation et vérifier cette hypothèse. Les résidus composant le NES de Rev du VIF n'ont pas été caractérisés en détail et les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que des résidus à l'extérieur du NES déjà décrit (Mancuso et al., 1994) sont importants pour que l'exportation de la protéine soit optimale. Sa séquence reste toutefois très différente des autres NES identifiés pour les protéines Rev.

Tableau 5.2. Séquences NES connues et identifiées dans l'étude des protéines Rev

NES connus	Séquence ¹	Références
Classe PKI NES		
Consensus	Φ^0XXΦ^1 XXXΦ^2 XXΦ^3XΦ^4	
PKI NES	I N E L A L K L A G L D I	Güttler et al., 2010
Rev VIH-1 NES		
Consensus	Φ^0Φ^1 XΦ^2 XXΦ^3XΦ^4	
Rev NES	L Q L P P L E R L T L	Fischer et al., 1995
Rev JDV NES		
Consensus	Φ^0XXΦ^1 XXXΦ^2 XXΦ^3XΦ^4	
Rev NES	M A E L E E R F E D L A L	Marchand et al., 2019
Rev VIF NES		
Rev NES	MTDLED RFRK LFGSPSKDEY	Mancuso et al., 1994

¹Les résidus hydrophobes qui composent le NES sont en gras.

Des chercheurs ont suivi l'évolution de la protéine Rev du VAIE jusqu'à 800 jours suivant l'infection de chevaux par ce virus. Ils ont séquencé le gène de la protéine et mesuré son activité d'exportation. Plusieurs mutations ont été observées dont la plupart affectant l'activité d'exportation de Rev (Sparks et al., 2008). Chez le VIH-1, des variations dans l'activité de Rev ont aussi été observées. Une diminution de l'activité de Rev entraîne une diminution de l'expression des gènes codant les protéines de structure. Ces protéines servent généralement d'antigènes cibles pour les cellules du système immunitaire. Une diminution de leur expression peut donc en conséquence atténuer la destruction du virus par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Des souches du VIH-1 provenant de patients asymptomatiques ont

montré une activité de Rev réduite, des niveaux de Gag réduits et une meilleure résistance aux LTC. Des variations dans Rev peuvent donc affecter les résultats cliniques de l'infection (Bobbitt et al., 2003) et contribuent aussi à l'évasion du virus du système immunitaire. L'étude de patients infectés par le VIH-1 a montré que plusieurs mutations corrélaient avec le phénotype du virus et que ces mutations se localisaient dans la région du génome contenant le RRE (Booth et al., 2014). Par conséquent, si le RRE est important pour la conformation des oligomères de Rev, des modifications dans sa séquence pourraient altérer sa capacité à orienter le NES des protéines Rev et ainsi influencer leur affinité pour Crm1 sous la forme de dimères et, par conséquent, l'efficacité d'exportation des ARN viraux. Ce mécanisme pourrait permettre à la protéine Rev du VIH-1 de réguler de façon précise l'exportation nucléaire durant l'infection (Booth et al., 2014; Jayaraman et al., 2014).

5.3. Le domaine de multimérisation

Afin de permettre l'exportation des ARN viraux, Rev doit former des oligomères au niveau du RRE. En effet, deux protéines au minimum doivent être liées au RRE (Hoffmann et al., 2012). Les domaines de multimérisation sont au nombre de deux et sont situés de part et d'autre du NLS chez la Rev du VIH-1. Ces domaines étant essentiels à la fonction de Rev, ils représentent une cible intéressante pour bloquer la réplication virale. Le domaine de multimérisation de la protéine Rev du VIH-1 a été caractérisé notamment à l'aide de techniques *in vitro* utilisant des agents réticulants (glutaraldéhyde ou diméthyl sulfate) pour fixer les interactions entre les protéines (Zapp et al., 1991). La multimérisation a aussi été étudiée en présence du RRE par la technique de retardement sur gel (Olsen et al., 1990; Madore et al., 1994; Jain and Belasco, 2001).

Les mutants JM1 et JM5 de la protéine Rev du JDV possèdent tous deux une séquence riche en acides aminés hydrophobes. Pour le VIH-1, ce sont principalement des leucines et des isoleucines qui forment le domaine de multimérisation ainsi qu'une valine et une alanine (Jain and Belasco, 2001). Il y a en effet plusieurs résidus leucines et isoleucines dans la séquence

délétée des deux mutants ciblés. Pour JM1, les aa les plus susceptibles de former le domaine de multimérisation seraient les résidus hydrophobes de la séquence 22-LLQRAV-26. Cette séquence est très homologue à celle de la protéine Rev du VIH-1 12-LLRAV-16 qui compose à la fois le SIN (signal d'inhibition de la diffusion nucléaire) et une partie du premier domaine de multimérisation (Kubota and Pomerantz, 2000). Pour JM5, les aa seraient contenus dans la séquence 90-FWGTLRGLV-98 homologue à la séquence 83-FWKSRLRELV-91 retrouvée chez la protéine Rev du VIB. Cette séquence a d'ailleurs été identifiée comme faisant partie du deuxième domaine de multimérisation (Marchand, 2015). Par conséquent, l'organisation des domaines de multimérisation de la protéine Rev du JDV ressemblerait beaucoup à celle du VIH-1 et du VIB (Figure 5.1). Cela est encourageant si l'on désire utiliser ces virus comme modèle dans le développement de stratégies anti-virales ciblant le domaine de multimérisation de Rev.

La multimérisation a été montrée comme importante pour l'accumulation de Rev dans le noyau afin de favoriser l'exportation des complexes. Il semblerait que la formation de dimères masque le NES de Rev empêchant ainsi l'exportation des protéines qui n'ont pas encore lié le RRE des ARN viraux (Behrens et al., 2017). En liant le RRE, la conformation de la protéine est modifiée pour exposer de façon optimale le NES pour promouvoir son interaction avec l'exportine Crm1 (Booth et al., 2014). De plus, Crm1 est présente sous une forme dimérique et doit donc lier un dimère de Rev contenant deux NES pour permettre l'exportation de Rev (Booth et al., 2014). Fait intéressant, chez la souris, la protéine Crm1 ne forme pas de dimère, car ce sont des résidus uniques aux primates qui forment une interface de dimérisation entre les monomères Crm1.

Le RRE améliore l'interaction Rev-Crm1, soutenant l'hypothèse que le NES de Rev doit être reconnu dans le contexte Rev-RRE approprié pour fonctionner adéquatement (Askjaer et al., 1999; Booth et al., 2014). Cela explique donc que des mutations dans la séquence du RRE menant à une activité d'exportation altérée sont retrouvées chez des patients infectés asymptomatiques (Jackson et al., 2016). Ce mécanisme permet au virus de modifier les niveaux d'expression des protéines de structure et par conséquent d'échapper à la surveillance immunitaire. De plus, la présence de plusieurs NES sur le complexe doit

également être importante pour transporter efficacement le RRE à travers le CPN puisque le nombre de récepteurs requis pour le transport nucléaire augmente avec la taille de la cargaison (Ribbeck and Görlich, 2002). Le RRE à lui seul est presque deux fois plus gros que les petits ARN de l'hôte qui utilisent Crm1 et est incorporé dans un ARNm beaucoup plus gros qui est lui-même lié à plus d'une protéine Rev. Il est donc logique que le complexe lie plus d'une molécule Crm1 afin d'être exporté.

5.4. Organisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev des lentivirus

Les protéines Rev caractérisées jusqu'à maintenant ont toutes montré la présence des domaines fonctionnels décrits pour la Rev du VIH-1. Le domaine de multimérisation est bipartite et est disposé de chaque côté du NLS pour tous les virus à l'exception du VAIE. Son domaine de multimérisation est monopartite et est situé loin en amont du NLS (Umunakwe et al., 2014). Le NLS de la protéine Rev du VIB est le seul bipartite. Le NLS de la protéine Rev du VIH-1, du VIF, du JDV et du VAIE sont tous de structure monopartite. Encore une fois, celui de la protéine Rev du VAIE se démarque des autres par sa courte séquence basique située tout au bout de l'extrémité C-terminale alors que les autres NLS ont une localisation plus centrale dans la séquence de la protéine (Figure 5.1). En ce qui concerne le NES, il est localisé dans l'extrémité C-terminale de la protéine suivant le NLS à l'exception du VAIE dans lequel le NES se trouve dans l'extrémité N-terminale. Finalement, le RBD de la protéine Rev des lentivirus bovins et des petits ruminants est bipartite. Seule le RBD de la protéine Rev du VIH-1 est monopartite. Comme le RBD du VIF n'a pas été déterminé, il n'est pas possible de se prononcer sur sa nature. Un petit regroupement de résidus basiques bien conservé à l'extrémité C-terminale pourrait constituer une partie de ce domaine. Seules les protéines Rev du JDV et du VIB présentent une organisation similaire bien que la séquence qui compose ces domaines soit différente. Outre leur RBD bipartite, l'organisation générale des deux lentivirus bovins ressemble à celle du VIH-1 (Gomez Corredor, Marchand and Archambault, 2017; Böhnlein et al., 1991).

Comme les protéines Rev des lentivirus étudiés montrent des similitudes avec le VIH-1 quant à la présence de domaines fonctionnels de nature et d'organisation similaires, ces virus constituent de bons modèles d'étude dans le développement de stratégies antivirales visant l'activité de la protéine Rev. De l'autre côté, les différences découvertes dans les séquences de ces domaines fonctionnels rendent tout aussi pertinente une étude comparative de ces virus et faciliteront peut-être l'identification de facteurs favorisant l'activité de Rev et par conséquent la réplication du virus.

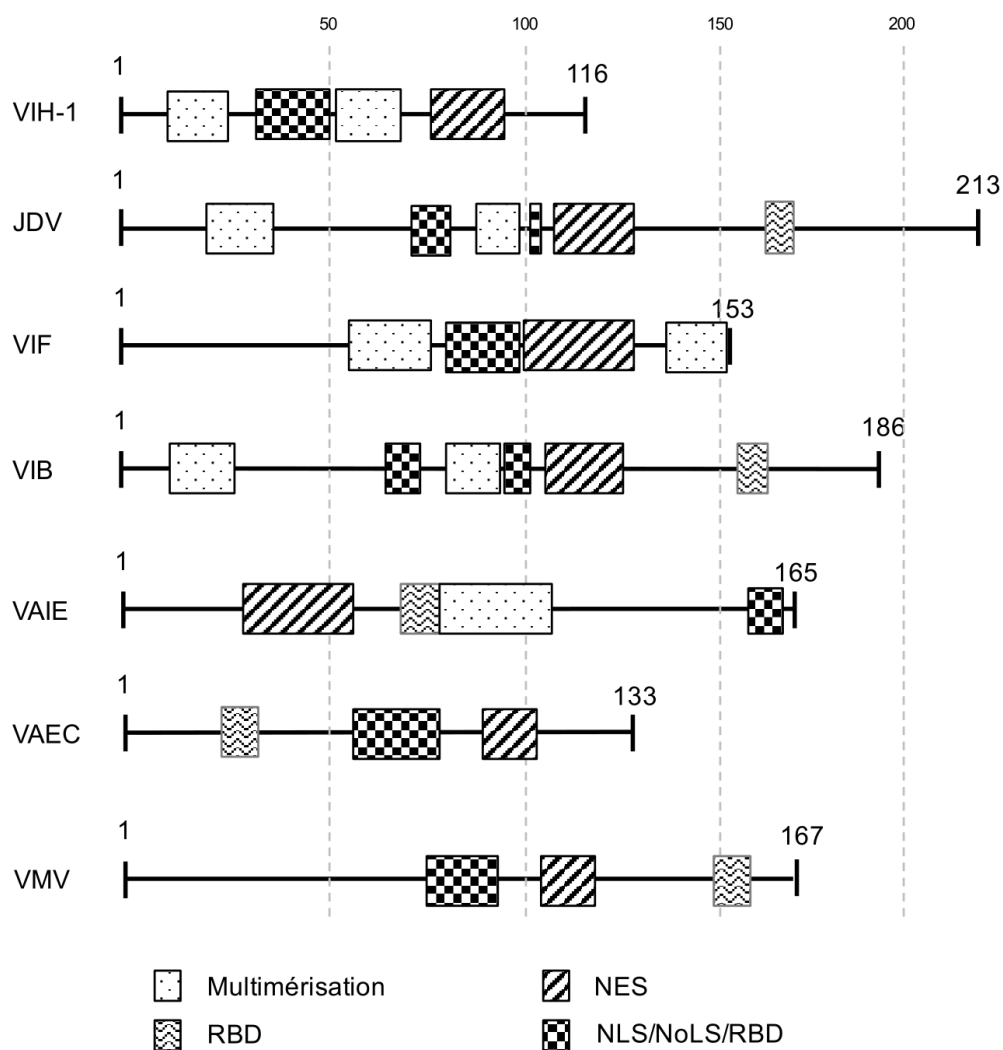


Figure 5.1. Domaines fonctionnels des protéines Rev des lentivirus.

Le domaine de liaison à l'ARN (RBD), signaux de localisation nucléaire (NLS) et nucléolaire (NoLS) et domaine d'exportation du noyau (NES) ainsi que les domaines de multimérisation sont indiqués sur la séquence de la protéine Rev.

En plus d'avoir étudié les domaines fonctionnels, des essais ont été réalisés dans le but d'identifier le RRE du JDV qui reste à ce jour encore non identifié. Une équipe de chercheurs ayant travaillé à prédire ces séquences à l'aide de programmes de prédiction des structures secondaires de l'ARN a suggéré deux régions contenant des structures complexes pouvant être associées au RRE (Lesnik et al., 2002). Des séquences provenant du gène de l'enveloppe du JDV ont donc été clonées dans un vecteur contenant un gène rapporteur CAT (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Des cellules ont été transfectées avec les différentes constructions et un vecteur codant pour la protéine Rev du JDV en fusion avec la EGFP et l'activité d'exportation de Rev a été mesurée (Annexe B.5, Figure B.6). Une région présentant une identité de 60% avec le RRE du VIB (contenue dans rre5 et rre6, Figure B.6) a donné des résultats modérés, mais encore inférieurs au signal obtenu pour le RRE du VIB. L'essai a donc aussi été réalisé avec les séquences RRE de d'autres lentivirus disponibles dans le laboratoire (Annexe B.4, Figure B.5). La Rev du JDV a semblé montrer une activité seulement en présence du RRE du VIB. La Rev du VIB et du VIF a montré une activité seulement en présence de leur RRE respectif. La Rev du VIH-1 a montré une très forte activité avec son RRE. D'autres constructions devront être générées afin de mieux cibler le RRE. Ce dernier pourrait aussi être utilisé pour cible afin de réduire la réplication virale.

5.5. Transport nucléo-cytoplasmique

Les petites molécules (40 kDa) peuvent diffuser passivement à travers le CPN. Récemment, il a été montré que des molécules plus grosses peuvent également diffuser de manière passive à travers le CPN, mais comme la barrière s'intensifie progressivement avec l'augmentation de la masse moléculaire, ce processus devient inefficace et très lent pour les grosses molécules (Timney et al., 2016). Même si la protéine Rev est suffisamment petite pour

diffuser passivement, elle possède un NLS capable de la transférer activement dans le noyau de façon plus efficace et spécifique que par simple diffusion. La voie d'importation de la protéine Rev n'a été étudiée que pour le VIH-1 et le VIB (Arnold et al., 2006, Gomez-Corredor and Archambault, 2012). La présente étude a montré que les protéines Rev du JDV et du VIF dépendent toutes deux d'un transport actif dépendant en partie ou fortement de l'importine β .

Les protéines karyophérine β (importines et exportines) sont responsables de la majorité du transport nucléo-cytoplasmique dans la cellule. Au moins vingt membres ont été identifiés dans cette famille chez l'homme (Mosammaparast and Pemberton, 2004). Chaque karyophérine β semble lier des substrats différents, ce qui suggère que chacune reconnaît un ou plusieurs signaux de localisation nucléaire différents. Cependant, la grande diversité de séquences liant un même récepteur empêche l'identification d'un consensus de NLS.

Les NLS classiques sont des séquences courtes, riches en lysine, qui se lient à une protéine adaptatrice appelée importine α , qui forme ensuite un hétérodimère avec l'importine β 1, qui à son tour intervient dans l'importation nucléaire (Conti and Izaurralde, 2001). La plupart des autres protéines importées dans le noyau n'utilisent pas un tel adaptateur et se lient directement à l'importine β . La plupart des protéines qui se lient à l'importine β 1 présentent peu d'homologie de séquence ou de structure et, par conséquent, les caractéristiques générales parmi les substrats de cette voie ne peuvent être déterminées (Lee et al., 2006). Outre ces deux voies, les protéines peuvent utiliser l'importine β 2 aussi bien connue sous le nom de transportine.

5.5.1. Importines β

Les protéines EGFP-Rev et EGFP-RevNLS étaient encore observables dans le noyau après le traitement avec l'importazole qui a pour effet de bloquer les voies d'importation utilisant l'importine β 1. Trois possibilités pourraient expliquer ce résultat. Premièrement, la

protéine aurait pu pénétrer dans le noyau avant le traitement et ne pas être sortie de ce compartiment avant la fixation des cellules. Deuxièmement, le traitement n'est peut-être pas efficace pour bloquer la totalité de l'importation. Des concentrations plus élevées auraient pu être testées et ce pour des temps d'incubation plus longs. Enfin, cela pourrait refléter qu'une voie d'importation alternative médiée par d'autres importines, comme montré pour le VIH-1 ou encore par l'importine α indépendamment de l'importine β . Cette dernière hypothèse pourrait être testée avec l'utilisation d'un mutant importin α Δ IBB, une protéine qui ne peut pas se lier à l'importine β , mais qui peut quand même diriger l'importation nucléaire de certaines protéines seules (Miyamoto et al., 2002). Afin de réduire les limitations, un essai utilisant une protéine de plus haut poids moléculaire (Rev- β Gal-EGFP) purifiée en présence de noyaux isolés dans un milieu donné contenant les facteurs d'importation d'intérêt pourrait être effectué (Niepel et al., 2017). Dans ce cas, les autres voies d'importation active comme passive seraient éliminées. De plus, la présence de Rev dans le noyau avant le traitement serait aussi évitée.

5.5.2. Importines α

Chez les mammifères, il existe sept sous-types d'importines α qui sont regroupés en trois sous-familles en fonction de leur homologie de séquence (Figure 5.2). La première sous-famille regroupe les importines $\alpha 1$ et $\alpha 8$. Comme l'importine $\alpha 8$ a été découverte plus tard, encore peu d'informations sur sa fonction sont disponibles. De plus, l'expression de cet isotype n'a pu être montrée que dans les ovaires et les embryons au stade précoce et dans la pulpe dentaire lors d'une inflammation (Huang et al., 1999; Tejomurtula et al., 2009). Quant à elle, l'importine $\alpha 1$ joue un rôle important dans l'importation de cargaisons possédant un NLS classique (Köhler et al., 1999). La deuxième sous-famille regroupe les importines $\alpha 3$ et $\alpha 4$. Ces deux protéines jouent un rôle dans le transport de cargaisons importants tel que le facteur de transcription NF- κ B (Fagerlund et al., 2005). La troisième sous-famille comporte les importines $\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\alpha 7$. Contrairement aux deux autres, l'expression de l'importine $\alpha 6$ est restreinte aux testicules. Les importines de cette sous-famille interagissent avec des protéines virales entre autres (Pumroy and Cingolani, 2015). Par exemple, l'importine $\alpha 5$ interagit avec

la protéine UL84 du cytomégalo virus humain (Lischka, Sorg et al., 2003) et la protéine Vpr du VIH-1 (Popov, Rexach et al., 1998). Toutes trois peuvent aussi interagir avec la protéine VP24 du virus Ebola (Reid et al., 2006). Tous les isotypes sont exprimés dans les cellules adultes, à l'exception des importines $\alpha 6$ et $\alpha 8$ tel que mentionné ci-haut (Köhler et al., 1997; Tsuji et al., 1997). Cependant, leur abondance relative en fonction des différents tissus et organismes n'est pas très bien connue.

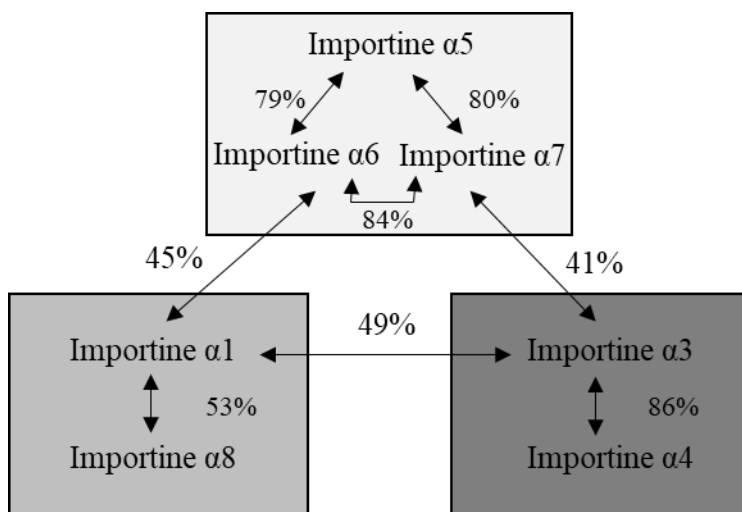


Figure 5.2. Homologie de séquence entre les différentes importines.

Tirée de : Miyamoto et al., 2016.

Toutes les importines α partagent une structure similaire composée d'un domaine d'autoinhibition à l'extrémité N-terminale appelé IBB ainsi qu'un centre hélicoïdal en C-terminal contenant des motifs Armadillo. Ces motifs sont constitués d'une quarantaine d'acides aminés organisés en une séquence répétitive. Cependant, des différences dans leur structure tertiaire et leurs propriétés biochimiques font en sorte que chaque isotype se spécialise pour des cargaisons différentes *in vivo* (Pumroy and Cingolani, 2015). Le domaine IBB contient une séquence basique en deux parties qui occupe la surface de liaison au NLS de l'importine α en absence de l'importine β . Ce mécanisme d'autoinhibition empêche qu'une importine α non liée à une cargaison portant un NLS puisse lier l'importine β et ne soit transportée dans le noyau (Pumroy et al., 2015). L'habileté à surmonter le mécanisme

d'autoinhibition dépend de la séquence NLS. À titre d'exemple, les NLS monopartites, comme celui de l'antigène grand T du SV-40, sont souvent insuffisants pour outrepasser ce mécanisme et ne peuvent lier l'importine α qu'en présence de l'importine β (Kobe, 1999). Cependant, certains NLS non classiques ou composés de deux séquences très basiques peuvent efficacement lier l'importine α en absence de l'importine β . C'est le cas de la protéine PB2 du virus de l'influenza A et de Vpr du VIH-1 (Nitahara-Kasahara et al., 2007). Les protéines Rev du VIH-1, VIB, JDV et du VIF ont toutes pu lier l'importine α en absence de l'importine β dans un test *in vitro* utilisant des protéines purifiées (Figure 4.5). Cela indique que bien que les séquences NLS des protéines Rev soient toutes très différentes les unes des autres, leur caractère hautement basique leur permet d'outrepasser le mécanisme d'autoinhibition des importines α . Cependant, il ne suffit pas à une protéine de pouvoir lier une importine donnée pour que celle-ci permette son importation. En effet, ce mécanisme de régulation a été montré avec les facteurs de transcription neuronaux Oct6 et Brn2. Tous deux peuvent lier plusieurs isotypes d'importine α . Toutefois, bien que la liaison à l'importine $\alpha5$ mène avec succès à leur importation dans le noyau, leur interaction avec l'importine $\alpha1$ mène à une inhibition de leur importation et la rétention de l'importine au cytoplasme (Yasuhara et al., 2013). Le mécanisme de cette régulation reste inconnu à ce jour. Si une telle régulation est appliquée au niveau de l'importation des protéines virales, on peut donc penser que les niveaux d'expression des différents isotypes peuvent influencer la susceptibilité d'un type cellulaire à l'infection. Cela indique aussi que ce n'est pas parce que les protéines Rev étudiées dans cette étude peuvent interagir avec toutes les importines α testées *in vitro* que celles-ci vont permettre l'importation de Rev *in vivo*. Il serait donc intéressant d'étudier la participation de chaque sous-famille d'importines α dans l'importation de Rev en utilisant des protéines purifiées et des cellules perméabilisées (Cassany and Gerace, 2009). Il est aussi possible que tous les isotypes puissent permettre le transport de Rev, mais à des niveaux différents dans le sens où certains isotypes seraient préférés à d'autres. Ce phénomène a été observé pour la protéine PB2 du virus influenza A qui, bien qu'elle peut interagir avec plusieurs isotypes, utilise préférentiellement les importines $\alpha3$ et 7 (Pumroy et al., 2015). La même chose est observée pour la protéine Vpr du VIH-1 qui peut lier toutes les importines α mais qui montre une préférence marquée pour l'importine $\alpha5$ (Nitahara-Kasahara et al., 2007).

De plus, dans la présente étude, la protéine Rev du VIB a pu lier toutes les importines α testées alors que seulement deux d'entre elles ont été montrées comme importantes pour une importation efficace de la protéine au noyau (Gomez Corredor and Archambault, 2012). Cette préférence pourrait être expliquée par les différents degrés d'autoinhibition des différents isotypes d'importine α . Si une protéine peut contrer plus facilement le mécanisme d'autoinhibition d'un isotype, il est logique de penser que ce dernier sera préféré à un autre ou du moins plus efficace.

Les quelques études qui existent ont montré des différences dans les niveaux d'expression des différents isotypes en fonction des tissus, mais aussi en fonction du stade de développement (Miyamoto et al., 2016). Pendant la croissance et le développement cellulaire, un mécanisme de régulation commun utilisé pour inactiver une protéine particulière consiste à la localiser dans le mauvais compartiment. Lorsque son activité est nécessaire, la protéine peut être transportée dans le bon compartiment. Par conséquent, plusieurs mécanismes doivent exister pour activer et désactiver le transport d'une cargaison donnée tels que le masquage du NLS ou du NES, la séquestration de la cargaison par interaction ou encore la modification de l'expression des karyophérines nécessaires à son transport. Il serait instructif de mesurer les niveaux d'expression des différents isotypes d'importine α dans différents types cellulaires à un stade de développement donné. Ensuite, il serait possible de déterminer si ces niveaux sont affectés par une infection virale. Une étude récente a montré que l'importine β est détectée à des niveaux beaucoup plus élevés dans les cellules lors d'une infection virale aiguë (Nuovo et al., 2018). Il est donc envisageable que l'expression d'autres importines soit aussi affectée comme c'est le cas dans certains cancers (Miyamoto et al., 2016).

5.5.3. Transportine

Bien que plusieurs substrats utilisant cette voie aient été identifiés, il est très difficile d'établir un consensus puisque les protéines utilisant cette voie ont des structures et des séquences variées. La séquence NLS la mieux étudiée dans ce cas est la séquence M9 de la protéine hnRNP A1 humaine. En étudiant attentivement les résidus de M9 interagissant avec la transportine, des consensus comprenant un motif hydrophobe ou basique central suivi d'un

motif C-terminal R/K/H-X(2-5)-PY ont pu être élaborés (Figure 5.3) (Lee et al., 2006). Les résidus PY ne sont pas retrouvés dans la séquence des protéines Rev étudiées ni même dans celle de Rev du VIH-1 qui a pourtant été montrée comme utilisant cette voie d'importation. Bien sûr ce n'est pas la totalité des substrats déjà identifiés pour cette voie qui possèdent un tel consensus. Mis à part le consensus, deux règles semblent importantes pour que le NLS puisse interagir avec la transportine ; la séquence doit être désordonnée structurellement et doit aussi avoir une charge nette positive (Lee et al., 2006). Dans ce cas, plusieurs séquences de Rev pourraient constituer un tel NLS. Une séquence répondant à ces critères est retrouvée dans la protéine Rev du JDV correspondant à quelques résidus près du NLS décrit dans cette thèse avec une charge nette prédite de +9 à pH 7.0 et est dépourvue de structure tertiaire. Pour le VIF, une seule petite séquence correspond à ces critères avec une charge de +1, mais semble très courte par rapport aux séquences déjà identifiées. Toutefois, aucune séquence ne semble remplir ces critères dans la protéine Rev du VIH-1 alors qu'elle peut utiliser la transportine pour son importation. D'après des études de liaison, on sait que la partie C-terminale de la transportine se lie à la séquence M9. Rev, en revanche, interagit spécifiquement avec la partie N-terminale de la transportine (Arnold et al., 2006). Il est donc possible que la séquence pouvant lier la transportine chez la protéine Rev diffère de celles préalablement identifiées.

Par conséquent, il serait intéressant de déterminer dans un premier temps si les protéines Rev des autres lentivirus peuvent aussi utiliser la transportine pour entrer dans le noyau. Cela peut être réalisé en utilisant la transportine comme facteur cytosolique dans l'essai *in vitro* utilisant les cellules HeLa perméabilisées en remplacement du lysat de réticulocyte de lapin. Dans un deuxième temps, la région importante pour cette interaction, si elle existe, pourra être déterminée en utilisant les mutants de délétions couplés à la EGFP décrits ici dans un test de coimmunoprécipitation ou avec des essais d'interaction en plaque de style ELISA en utilisant les protéines mutantes purifiées couplées à l'étiquette His. L'étude des protéines permettant le transport de Rev au noyau est importante pour identifier les voies qui peuvent être ciblées pour bloquer la réplication du virus.

hnRNP A1 (M9NLS)	263	FGNYNNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPY	289
hnRNP D	329	YGDYSNQSGYGKVSRRGGHQNSYKPY	355
TAP	49	SSRLEEDGDVAMSDAQDGPRVRYNPY	75
HuR	212	HHQAQRFRFSPMGVDHMSGLSGVNVPG	238
hnRNP F	184	FKSSQEEVRSYSDPPLKFMSVQRPGPY	210
hnRNP M	38	GGERPAQNEKRKEKNIKRGGNRFEPY	64
PQBP-1	161	RDRGYDKADREEGKERRHHRREELAPY	187

Figure 5.3. Séquences NLS connues se liant à la transportine.

hnRNP pour « Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein », TAP pour « Transporter associated with antigen processing », HuR pour « Human antigen R », PQBP-1 pour « polyglutamine tract-binding protein ». Les nombres dans le tableau indiquent la position des acides aminés dans la protéine. Tiré de Lee et al., 2006.

5.6. Interaction avec le nucléole

Bien que la nucléoline et B23 ne soient détectées pratiquement que dans les noyaux, il a été montré depuis un certain temps qu'elles naviguent constamment entre le noyau et le cytoplasme (Borer et al., 1989). La présence de ces protéines dans le cytoplasme a donc permis de suggérer un rôle pour ces protéines nucléolaires dans le transport nucléocytoplasmique des composants ribosomiques. Ce rôle a été confirmé pour la protéine B23 avec la protéine Rev du VIH-1. B23 n'est pas essentielle à la localisation nucléaire de Rev, mais augmente considérablement l'accumulation nucléaire de celle-ci (Szebeni et al., 1997). De plus, le traitement de cellules avec un peptide bloquant l'interaction entre B23 et la protéine Rev du VIH-1 réduit considérablement la réplication du virus (Nouri et al., 2015). Dans l'étude de l'interaction entre B23 et la protéine Rev du VIB, il a été montré que la présence de B23 favorise également la réplication virale, mais l'accumulation de Rev au noyau n'a pas été mesurée dans les cellules normales comparées aux cellules knock-down pour B23 (Passos-Castilho et al., 2018; Annexe A). Il serait intéressant de vérifier si le mécanisme dépendant de

B23 est le même pour les deux virus. De plus, toutes les protéines Rev testées ont montré une forte affinité pour B23.

L'accumulation d'une protéine dans le nucléole n'indique pas systématiquement qu'elle y exerce une fonction. Il est possible de penser que l'interaction avec des protéines du nucléole se fait via des interactions électrostatiques grâce à la charge positive des NoLS et la charge négative de certaines protéines nucléolaires et des ARN. Il a été montré que certains NoLS peuvent interagir avec la protéine B23. Cette dernière contient deux séquences d'acides aminés acides (¹²⁰EEDAEESEDEEEED¹³² et ¹⁶¹DEDDDDDEEDDDDEDDDDDFDDEEA EE¹⁸⁸) lui conférant une charge négative. Une interaction entre B23 et un NoLS serait donc électrostatique comme observée pour les ARN qui sont aussi chargés négativement (Musinova et al., 2011). D'ailleurs, seul le mutant de Rev du VIB dans lequel toutes les arginines avaient été remplacées par des alanines ne pouvait plus lier B23 et sa séquence NoLS était suffisante pour précipiter B23 (Annexe A). Des séquences acides sont aussi retrouvées chez la nucléoline qui semble interagir avec les différentes protéines Rev, mais de façon moins importante comme montré par coimmunoprécipitation. Fait intéressant, le test en plaque utilisant l'extrait nucléolaire n'a pas montré d'interaction avec la nucléoline alors que l'immunoprécipitation pour laquelle l'extrait cellulaire complet a été utilisé a montré une interaction (Figure 4.7). Il se pourrait que cette interaction ne soit pas directe et soit plutôt dépendante d'une protéine qui n'est pas retrouvée au nucléole. La nucléoline est importante pour la réplication de plusieurs virus (Rawlinson and Moseley, 2015) et son niveau d'expression est souvent augmenté dans certaines infections virales et dans plusieurs cancers. Jouant un rôle important dans la synthèse des ribosomes et la régulation de la chromatine, sa surexpression favorise la prolifération cellulaire et la survie des cellules et est donc propice à une réplication virale efficace (Gregório et al., 2018).

Certaines protéines de l'hôte, essentielles pour la réplication, peuvent limiter la réplication du virus dans certains types cellulaires en fonction de leur localisation. Par exemple, la protéine DDX1 se localise dans la plupart des cellules au nucléole. L'interaction de Rev du VIH-1 avec cette protéine via son signal d'inhibition de la diffusion nucléaire (SIN)

favorise une réplication virale optimale. Par contre, un mutant de Rev ne portant pas le domaine SIN est redistribué au cytoplasme et la réplication virale diminue (Fang et al., 2005). Les astrocytes humains supportent mal la réplication du VIH-1. En analysant la présence de DDX1 dans ces cellules, les chercheurs ont observé que la protéine était localisée au cytoplasme (Fang et al., 2005). La présence de facteurs nucléolaires dans différentes cellules et leur distribution semble donc aussi importante que la présence de domaines fonctionnels compétents dans la protéine Rev. Il n'existe malheureusement pas de données sur la localisation de Rev lors d'une infection par le JDV pour confirmer les observations faites ici. Cependant, comme la protéine Rev du JDV a montré une localisation très cytoplasmique en comparaison aux autres Rev, et qu'aucune cellule permissive à l'infection n'a pu être trouvée mis à part les lignées primaires de bovins provenant de Bali, il se pourrait qu'un tel facteur existe et soit spécifique aux individus bovins susceptibles à l'infection. Il serait intéressant de comparer l'expression et la localisation des protéines de l'hôte ayant été identifiées comme essentielles à la réplication du virus entre des cellules permissives et non permissives.

5.7. Perspectives

L'identification des domaines fonctionnels de Rev permet de mieux comprendre le cycle de réplication des lentivirus et leur évolution. En ajoutant à cela l'identification des protéines de l'hôte qui interagissent avec les protéines virales, il est possible d'identifier de nouvelles cibles anti-virales.

Cibler les composants des cellules hôtes peut mener à des effets secondaires néfastes pour l'organisme alors que de cibler spécifiquement les protéines virales entraînerait une sélection positive rapide des mutants pouvant résister au traitement. Par contre, si on essaie plutôt de cibler l'interface virus-hôte en bloquant les interactions, la résistance virale et les effets secondaires seront moins probables bien que possibles selon la cible.

Par exemple, l'identification de partenaire d'interaction nucléolaire tel que le facteur d'initiation eIF-5A pour la Rev du VIH-1 a permis le développement d'une petite molécule, le 1,8-diaminooctane. Cette molécule bloque la formation de l'hypusine, un acide aminé unique et essentiel à l'activité de eIF-5A. La présence de cette molécule entraîne une réduction significative de la réplication virale. Les protéines cellulaires favorisant le transport nucléocytoplasmique de Rev représentent aussi des cibles intéressantes. De petites molécules pouvant altérer l'importation nucléaire de la protéine de la capsid du VEEV (Venezuelan equine encephalitis virus) ont été découvertes. Ces dernières bloquent la formation du complexe importine α : β 1 : CP. Elles se sont avérées efficaces pour inhiber la réplication virale avec une cytotoxicité très faible (Thomas et al., 2018). Autre exemple dans cette catégorie, l'ivermectine, un inhibiteur du transport nucléaire, s'est avéré efficace pour réduire la réplication virale du virus Hendra, un virus mortel pour l'humain, en ciblant l'importation de la protéine V du virus (Atkinson et al., 2018). De plus, l'ivermectine est un médicament déjà approuvé par la FDA afin de traiter des infections parasitaires. Il serait intéressant de tester ces inhibiteurs sur la réplication des lentivirus.

Bien que le macaque soit largement utilisé comme modèle animal pour la recherche sur le SIDA, aucun modèle animal à lui seul n'est suffisant pour étudier tous les aspects du VIH-1. D'autres lentivirus tels que le VIB, le JDV et le VIF peuvent constituer d'autres modèles animaux pour étudier certains aspects du VIH. De plus, la recherche fondamentale est importante pour approfondir nos connaissances sur les lentivirus.

Conclusion

Les travaux réalisés dans la cadre de cette thèse ont permis de caractériser la protéine Rev du JDV et partiellement celle du VIF. Le NLS du JDV s'est avéré être de structure monopartite et composé uniquement d'arginines avec un NoLS composé de résidus formant le NLS en plus de deux résidus arginines en aval. La séquence d'espacement qui sépare les deux séquences du NoLS est de 16 acides aminés. Quant à lui, le NLS du VIF a été montré comme possédant une structure monopartite comme celui décrit pour le VIH-1, mais composé d'une plus grande quantité de résidus dont la majorité sont des lysines et quelques arginines. Le NoLS du VIF est aussi associé en partie au NLS. Le NES du JDV appartient à la classe PKI avec une séquence optimale. Celui du VIF reste à caractériser, mais il semble atypique en comparaison aux autres NES caractérisés.

La caractérisation partielle de la voie d'importation indique que la protéine Rev du JDV utiliserait une voie d'importation similaire à celle décrite pour le VIB. Bien que la Rev du VIF possède un NLS monopartite comme le VIH-1, la protéine ne semble pas utiliser la même voie d'importation. Encore une fois, des tests supplémentaires devront être effectués pour confirmer ces données et identifier d'autres mécanismes impliqués.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse de doctorat a permis la caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev du JDV et certains domaines pour celle du VIF. Les résultats ont clairement montré que chaque protéine Rev possède des caractéristiques qui la distinguent des autres protéines Rev lentivirales. Les résultats obtenus contribueront à mieux comprendre les lentivirus et à l'élaboration de nouvelles thérapies antivirales.

Confrontée au développement rapide de résistance aux antiviraux utilisés actuellement, la recherche sur Rev est loin d'être terminée. Approfondir nos connaissances sur les modes d'action de Rev et les variations qui existent entre les différents lentivirus permettra de fournir

une série de modèles afin de mieux comprendre les mécanismes d'expression des gènes cellulaires et viraux. De plus, chaque nouveau rôle découvert rend la protéine Rev plus pertinente en tant que cible thérapeutique.

Bibliographie

Abelson, M. L. and R. V. Schoborg (2003). "Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE." Virus Research **92**(1): 23-35.

Ali, S., and A. Steinkasserer. (1995). "PCR-ligation-PCR mutagenesis : a protocol for creating gene fusions and mutations." Biotechniques **18**: 746-750.

Aminev, A.G., Amineva, S.P., Palmenberg, A.C. (2003). "Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription." Virus Research **95**: 59-73.

Arnold, M., Nath, A., Hauber, J., Kehlenbach, R.H. (2006). "Multiple Importins Function as Nuclear Transport Receptors for the Rev Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1." Journal of Biological Chemistry **281**(30): 20883-20890.

Askjaer, P., et al. (1999). "RanGTP-Regulated Interactions of CRM1 with Nucleoporins and a Shuttling DEAD-Box Helicase." Molecular and Cellular Biology **19**(9): 6276.

Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L., Kjems, J. (1998). "The Specificity of the CRM1-Rev Nuclear Export Signal Interaction Is Mediated by RanGTP." Journal of Biological Chemistry **273**: 33414-33422.

Atkinson, S. C., et al (2018). "Recognition by host nuclear transport proteins drives disorder-to-order transition in Hendra virus V." Scientific Reports **8**(1): 358.

Barboni, P., et al. (2001). "Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali." Veterinary Microbiology **80**(4): 313-327.

Beebe, A. M., et al. (1994). "Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets." Journal of Virology **68**(5): 3080-3091.

Behrens, R. T., et al. (2017). "Nuclear Export Signal Masking Regulates HIV-1 Rev Trafficking and Viral RNA Nuclear Export." Journal of Virology **91**(3): e02107-02116.

Belshan, M., et al. (1998). "Biological Characterization of Rev Variation in Equine Infectious Anemia Virus." Journal of Virology **72**(5): 4421-4426.

Belshan, M., et al. (2000). "Binding of Equine Infectious Anemia Virus Rev to an Exon Splicing Enhancer Mediates Alternative Splicing and Nuclear Export of Viral mRNAs." Molecular and Cellular Biology **20**(10): 3550-3557.

Bendinelli, M., et al. (1995). "Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen." Clinical Microbiology Reviews **8**(1): 87-112.

- Ben Haij, N., Leghmari, K., Planes, R., Thieblemont, N., Bahraoui, E. (2013). "HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF-alpha and IL-10." Retrovirology 10:123.
- Bevington, J.M., et al. (2007). "Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions." Virology 357: 102-113.
- Blissenbach, M., et al. (2010). "Nuclear RNA Export and Packaging Functions of HIV-1 Rev Revisited." Journal of Virology 84(13): 6598-6604.
- Bobbitt, K. R., et al. (2003). "Rev Activity Determines Sensitivity of HIV-1-Infected Primary T Cells to CTL Killing." Immunity 18(2): 289-299.
- Boese, A., et al. (2001). "The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain." FEBS Letters 493(2-3): 117-121.
- Bogerd, H. and W. C. Greene (1993). "Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo." Journal of Virology 67(5): 2496-2502.
- Bogerd, H. P., et al. (1998). "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Rev and Human T-Cell Leukemia Virus Rex Function, but Not Mason-Pfizer Monkey Virus Constitutive Transport Element Activity, by a Mutant Human Nucleoporin Targeted to Crm1." Journal of Virology 72(11): 8627-8635.
- Böhnlein, E., et al. (1991). "Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex." Journal of Virology 65(12): 7051-7055.
- Boisvert, F.-M., et al. (2007). "The multifunctional nucleolus." Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 574.
- Booth, D. S., et al. (2014). "The export receptor Crm1 forms a dimer to promote nuclear export of HIV RNA." eLife 3: e04121.
- Borer, R. A., et al. (1989). "Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm." Cell 56(3): 379-390.
- Bouillant, A.M., Ruckerbauer, G.M., Nielsen, K.H. (1989). "Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections in vitro." Research in Virology 140: 511-529.
- Brameier M, K. A., MacCallum RM. (2007). "NucPred— Predicting nuclear localization of proteins." Bioinformatics 23(9): 1159-1160.

- Braun, M.J., Lahn, S., Boyd, A.L., Kost, T.A., Nagashima, K., Gonda, M.A. (1988). "Molecular cloning of biologically active proviruses of bovine immunodeficiency-like virus." Virology **167**: 515-523.
- Brujeni, G.K., et al. (2010). "Bovine Immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle." Journal of Infection in Developing Countries **4**: 576-579.
- Brown, W. C., et al. (1991). "Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes." Journal of Virology **65**(6): 3359-3364.
- Buchwalter, A. and M.W. Hetzer (2017). "Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging." Nature Communications **8**: 328.
- Burkala, E. J., et al. (1999). "Serological evidence of an Australian bovine lentivirus." Veterinary Microbiology **68**(1): 171-177.
- Carpenter, S., et al. (1992). "Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus." Journal of Virology **66**(2): 1074-1083.
- Cassany, A. and L. Gerace (2009). "Reconstitution of Nuclear Import in Permeabilized Cells." Methods in Molecular Biology (Clifton, N.j.) **464**: 181-205.
- Casu, F., et al. (2013). "The Arginine-Rich RNA-Binding Motif of HIV-1 Rev Is Intrinsically Disordered and Folds upon RRE Binding." Biophysical Journal **105**(4): 1004-1017.
- Chadwick, B. J., et al. (1995). "Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus." Journal of General Virology **76**(1): 189-192.
- Chadwick, B.J., Desport, M., Brownlie, J., Wilcox, G.E., Dharma, D.M. (1998). "Detection of Jembrana disease virus in spleen, lymph nodes, bone marrow and other tissues by in situ hybridization of paraffin-embedded sections." Journal of General Virology **79**: 101-106.
- Chande, A., et al. (2016). "S2 from equine infectious anemia virus is an infectivity factor which counteracts the retroviral inhibitors SERINC5 and SERINC3." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**(46):13197-13202.
- Chen, H., et al. (2000). "Jembrana Disease Virus Tat Can Regulate Human Immunodeficiency Virus (HIV) Long Terminal Repeat-Directed Gene Expression and Can Substitute for HIV Tat in Viral Replication." Journal of Virology **74**(6): 2703-2713.

Cingolani, G., et al. (1999). "Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α ." Nature **399**: 221.

Cochrane, A. W., et al. (1990). "Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function." Journal of Virology **64**(2): 881-885.

Colombo, E., Alcalay, M., Pelicci, P.G. (2011). "Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases". Oncogene **30**:2595-2609.

Cong, R., et al. (2012). "Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription." Nucleic Acids Research **40**: 9441-9454.

Conti, E. and E. Izaurralde (2001). "Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age." Current Opinion in Cell Biology **13**(3): 310-319.

Conti, E., et al. (1998). "Crystallographic Analysis of the Recognition of a Nuclear Localization Signal by the Nuclear Import Factor Karyopherin α ." Cell **94**(2): 193-204.

Corredor, A., et al. (2010). "Molecular and Biological Aspects of the Bovine Immunodeficiency Virus." Current HIV Research **8**(1): 2-13.

Couté, Y., et al. (2006). "Deciphering the human nucleolar proteome." Mass Spectrometry Reviews **25**: 215-234.

Cullen, B. R. (1991). "Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus." Journal of Virology **65**(3): 1053-1056.

B.R. Cullen, B.R. (2003). "Nuclear mRNA export: insights from virology." Trends in Biochemical Sciences **28**: 419-424.

Daelemans, D., et al. (2004). "In Vivo HIV-1 Rev Multimerization in the Nucleolus and Cytoplasm Identified by Fluorescence Resonance Energy Transfer." Journal of Biological Chemistry **279**(48): 50167-50175.

Dang, C. V. and W. M. Lee (1989). "Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins." Journal of Biological Chemistry **264**(30): 18019-18023.

Davis, L. (1995). "The Nuclear Pore Complex." Annual Review of Biochemistry **64**(1): 865-896.

de Parseval, A., et al. (2004). "Feline immunodeficiency virus targets activated CD4(+) T cells by using CD134 as a binding receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(35): 13044-13049.

de Parseval, A. and J. H. Elder (1999). "Demonstration that orf2 Encodes the Feline Immunodeficiency Virus Transactivating (Tat) Protein and Characterization of a Unique Gene Product with Partial Rev Activity." Journal of Virology **73**(1): 608-617.

Dean, G. A., et al. (1999). "Differential Cell Tropism of Feline Immunodeficiency Virus Molecular Clones In Vivo." Journal of Virology **73**(4): 2596-2603.

Deng, G., et al. (2006). "Internalization of Jembrana disease virus Tat: Possible pathway and implication." Virus Research **121**(2): 122-133.

Desport, M., et al. (2009). "Analysis of Jembrana disease virus replication dynamics in vivo reveals strain variation and atypical responses to infection." Virology **386**(2): 310-316.

Desport M., Lewis, J. (2010). "Jembrana Disease Virus: Host Responses, Viral Dynamics and Disease." Current HIV Research **8**: 53-65.

Dharma, D. M., Budiantono, A., Campbell, R.S., Ladds, P.S. (1991). "Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. III. Pathology." Journal of Comparative Pathology **105**(4): 397-414.

Dichamp, I., Seite, P., Agius, G., Barbarin, A., Beby-Defaux, A. (2014). "Human papillomavirus 16 oncoprotein E7 stimulates UBF1-mediated rDNA gene transcription, inhibiting a p53-independent activity of p14ARF." PLoS One **9**:e96136

DiMattia, M. A., et al. (2016). "The Structure of HIV-1 Rev Filaments Suggests a Bilateral Model for Rev-RRE Assembly." Structure **24**(7): 1068-1080.

Dingwall, C. and R.A. Laskey. (1991). "Nuclear targeting sequences- a consensus?" Trends in Biochemical Sciences **16**: 478-481.

Dong, X., et al. (2009). "Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1." Nature **458**(7242): 1136-1141.

Duan, Z. et al. (2014). "The nucleolar phosphoprotein B23 targets Newcastle disease virus matrix protein to the nucleoli and facilitates viral replication". Virology **452-453**: 212-222.

Dumbar, T.S., Gentry, G.A., Olson, M.O. (1989). "Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids." Biochemistry **28**: 9495-9501.

Emmott, E., et al. (2008). "Viral nucleolar localization signals determine dynamic trafficking within the nucleolus. ." Virology **380**: 191-202.

Emmott, E. and J. A. Hiscox (2009). "Nucleolar targeting: the hub of the matter." EMBO Reports **10**(3): 231-238.

English, R. V., Johnson, C.M., Gebhard, D.H., Tompkins, M.B. (1993). "In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus." Journal of Virology **67**(9): 5175-5186.

Ensoli, B., et al. (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." Journal of Virology **67**(1): 277-287.

Evans, D. T. and R. C. Desrosiers (2001). "Immune evasion strategies of the primate lentiviruses." Immunological Reviews **183**(1): 141-158.

Fagerlund, R., Kinnunen, L., Köhler, M., Julkunen, I., Melén, K. (2005). "NF- κ B Is Transported into the Nucleus by Importin α 3 and Importin α 4." Journal of Biological Chemistry **280**(16): 15942-15951.

Fagerness, A. J., Flaherty, M.T., Perry, S.T., Jia, B., Payne, S.L., Fuller, F.J. (2006). "The S2 accessory gene of equine infectious anemia virus is essential for expression of disease in ponies." Virology **349**(1): 22-30.

Fang, J., Acheampong, E., Dave, R., Wang, F., Mukhtar, M., Poerantz, R.J. (2005). "The RNA helicase DDX1 is involved in restricted HIV-1 Rev function in human astrocytes." Virology **336**(2): 299-307.

Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P., Laemmli, U.K. (1991). "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element." Molecular and Cellular Biology **11**(5): 2567-2575.

Fassati, A. (2006). "HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem." Retrovirology **3**: 74-74.

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 Biology **9**(1): 6-11.

Fineberg, K., et al. (2003). "Inhibition of Nuclear Import Mediated by the Rev-Arginine Rich Motif by RNA Molecules." Biochemistry **42**(9): 2625-2633.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., Luhrmann, R. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." Cell **82**: 475-483.

Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W. (1997). "CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals." Cell **90**(6): 1051-1060.

Freitas, N. and C. Cunha (2009). "Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins." Current Genomics **10**(8): 550-557.

- Fukuda, M., et al. (1997). "CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal." Nature **390**: 308.
- Fung, H. Y. Fu, S.C., Chook, Y.M. (2017). "Nuclear export receptor CRM1 recognizes diverse conformations in nuclear export signals." eLife **6**: e23961.
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J., Hall, M.N. (1991). "Nuclear protein localization". Biochimica et Biophysica Acta **1071** (1): 83-101.
- Garvey, K. .J, Oberste, M. S., Elser, J. E., Braunn, M. J., Gonda, M. A. (1990). "Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus." Virology **175**: 391-409.
- Gemeniano, M. C., Sawai, E.T., Leutenegger, C.M., Sparger, E.E.(2003). "Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Is Required for Virus Particle Formation and Virus Infectivity." Journal of Virology **77**(16): 8819.
- Gemeniano, M. C., Sawai, E.T., Sparger, E.E.(2004). "Feline immunodeficiency virus Orf-A localizes to the nucleus and induces cell cycle arrest." Virology **325**(2): 167-174.
- Goff, S. (2001). "Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways." Journal of Gene Medecine. **3**(6): 517-528.
- Gomez Corredor, A. and D. Archambault (2009). "The Bovine Immunodeficiency Virus Rev Protein : Identification of a Novel Lentiviral Bipartite Nuclear Localization Signal Harboring an Atypical Spacer Sequence." Journal of Virology **83**: 12842-12853.
- Gomez Corredor, A. and D. Archambault (2012). "The Bovine Immunodeficiency Virus Rev Protein: Identification of a Novel Nuclear Import Pathway and Nuclear Export Signal among Retroviral Rev/Rev-Like Proteins." Journal of Virology **86**(9): 4892-4905.
- Gomez Corredor, A.,Marchand, C., Archambault, D.. (2017). "Localization of the RNA Binding Domain of the Bovine Immunodeficiency Virus Rev Protein." Advances in Biotechnology and Microbiology **5**(2): 555664.
- Gonda, M.A., et al. (1987). "Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus." Nature **330**: 388-391
- Gonda, M.A., Luther, D.G., Fong, S.E., Tobin, G.J. (1994). "Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions." Virus Research **32**(2): 155-181.
- Görlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annual Review of Cell Develomenta Biology **15**: 607-660.

- Gregório, A. C., Lacerda, M., Figueiredo, P., Simões, S., Dias, S., Moreira, J.N. (2018). "Meeting the needs of breast cancer: A nucleolin's perspective." Critical Reviews in Oncology/Hematology **125**: 89-101.
- Groom, H. C. Anderson, E.C., Lever, A.M.. (2009). "Rev: beyond nuclear export." Journal of General Virology **90**(6): 1303-1318.
- Grünwald, D. and R. H. Singer (2010). "In Vivo Imaging of Labelled Endogenous β -actin mRNA During Nucleocytoplasmic Transport." Nature **467**(7315): 604-607.
- Guo, D., et al. (2014). "Muscovy duck reovirus p10.8 protein localizes to the nucleus via a nonconventional nuclear localization signal." Virology Journal **11**(1): 37.
- Güttler, T., et al. (2010). "NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1." Nature Structural & Molecular Biology **17**: 1367.
- Haase, A. T. (1986). "Pathogenesis of lentivirus infections." Nature **322**: 130.
- Hadian, K., et al. (2009). "Identification of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein-recognition Region in the HIV Rev Protein." The Journal of Biological Chemistry **284**(48): 33384-33391.
- Hahn, M. A. and D. J. Marsh (2007). "Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals." FEBS Letters **581**(26): 5070-5074.
- Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S., Shida, H.(1998). "Involvement of Human CRM1 (Exportin 1) in the Export and Multimerization of the Rex Protein of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1." Journal of Virology **72**(8): 6602-6607.
- Hakata, Y., Yamada, M., Shida, H.(2003). "A Multifunctional Domain in Human CRM1 (Exportin 1) Mediates RanBP3 Binding and Multimerization of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Rex Protein." Molecular and Cellular Biology **23**(23): 8751-8761.
- Hammond, J. A., Lamichhane, R., Millar, D.P., Williamson, J.R. (2017). "A DEAD-Box Helicase Mediates an RNA Structural Transition in the HIV-1 Rev Response Element." Journal of Molecular Biology **429**(5): 697-714.
- Harrich, D., Ulich, C., García-Martínez, L.F., Gaynor, R.B.(1997). "Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription." The EMBO Journal **16**(6): 1224-1235.
- Harris, M.E., Gontarek, R.R., Derse, D., Hope, T.J.(1998). "Differential Requirements for Alternative Splicing and Nuclear Export Functions of Equine Infectious Anemia Virus Rev Protein." Molecular and Cellular Biology **18**(7):3889-3899.

Hart, R. A., Billaud, J.N., Choi, S.J., Phillips, T.R.(2002). "Effects of 1,8-Diaminooctane on the FIV Rev Regulatory System." Virology **304**(1): 97-104.

Hartaningsih, N., Dharma, D.M., Soeharsono, S., Wilcox, G.E.(2001). "The induction of a protective immunity against Jembrana disease in cattle by vaccination with inactivated tissue-derived virus antigens." Veterinary Immunology and Immunopathology **78**(2): 163-176.

Hartmann, K. (2012). "Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review." Viruses **4**(11): 2684-2710.

Heger, P., et al. (1998). "Multimer Formation Is Not Essential for Nuclear Export of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Rex trans-Activator Protein." Journal of Virology **72**(11): 8659-8668.

Henderson, A.J., Connor, R.I., Calame, K.L. (1996). "C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines." Immunity **5**(1): 91-101.

Henderson, B.R. and A. Eleftheriou (2000). "A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals." Experimental Cell Research **256**: 213-224.

Henderson, B. R. and P. Percipalle (1997). "Interactions between HIV rev and nuclear import and export factors: the rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin- β 11 Edited by M. Yaniv." Journal of Molecular Biology **274**(5): 693-707.

Hiscox, J.A., Whitehouse, A., Matthews, D.A. (2010). "Nucleolar proteomics and viral infection." Proteomics, **10**: 4077-4086.

Hoffmann, D., et al. (2012). "Formation of Trans-Activation Competent HIV-1 Rev:RRE Complexes Requires the Recruitment of Multiple Protein Activation Domains." PLoS ONE **7**(6): e38305.

Hofmann, W., et al. (2001). "Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (Rre)–And Constitutive Transport Element (Cte)–Containing Retroviral Rnas: An Unexpected Role for Actin." The Journal of Cell Biology **152**(5): 895-910.

Hope, T. J. (1997). "Viral RNA export." Chemistry & Biology **4**(5): 335-344.

Hope, T. J., Bond, B.L., McDonald, D., Klein, N.P., Parslow, T.G.(1991). "Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif." Journal of Virology **65**(11): 6001-6007.

Horke, S., Reumann, K., Schweizer, M., Will, H., Heise, T.. (2004). "Nuclear Trafficking of La Protein Depends on a Newly Identified Nucleolar Localization Signal and the Ability to Bind RNA." Journal of Biological Chemistry **279**(25): 26563-26570.

- Horzinek, M., et al. (1991). "Bovine Immunodeficiency Virus: Immunochemical Characterization and Serological Survey." Journal of General Virology **72**(12): 2923-2928.
- Hua, J., Caffrey, J.J., Cullen, B.R. (1996). "Functional Consequences of Natural Sequence Variation in the Activation Domain of HIV-1 Rev." Virology **222**(2): 423-429.
- Huang, G. T., Potente, A.P., Kim, J.W., Chugal, N., Zhang, X. (1999). "Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **88**(2): 214-220.
- Huang, W.H., Yung, B.Y., Syu, W.J., Lee, Y.H. (2001). "The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication." Journal of Biological Chemistry **276**: 25166-25175
- Huang, X. J., et al. (1991). "Minimal Rev-response element for type 1 human immunodeficiency virus." Journal of Virology **65**(4): 2131-2134.
- Hutten, S., Wälde, S., Spillner, C., Hauber, J., Kehlenbach, R.H. (2009). "The nuclear pore component Nup358 promotes transportin-dependent nuclear import." Journal of Cell Science **122**(8): 1100.
- Indik, S., Günzburg, W.H., Salmons, B., Rouault, F. (2005). "A novel, mouse mammary tumor virus encoded protein with Rev-like properties." Virology **337**: 1-6.
- Isgro, T. A. and K. Schulten (2005). "Binding Dynamics of Isolated Nucleoporin Repeat Regions to Importin-β." Structure **13**(12): 1869-1879.
- Issel, C. and L. Foil (1984). "Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects." Journal of the American Veterinary Medical Association **184**(3): 293-297.
- Iversen, A. K., et al. (1995). "Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual." Journal of Virology **69**(9): 5743-5753.
- Jackson, P. E., Tebit, D.M., Rekosh, D., Hammarskjöld, M.L.(2016). "Rev-RRE Functional Activity Differs Substantially Among Primary HIV-1 Isolates." AIDS Research and Human Retroviruses **32**(9): 923-934.
- Jain, C. and J. G. Belasco (2001). "Structural Model for the Cooperative Assembly of HIV-1 Rev Multimers on the RRE as Deduced from Analysis of Assembly-Defective Mutants." Molecular Cell **7**(3): 603-614.
- Jayaraman, B., et al. (2014). "RNA-directed remodeling of the HIV-1 protein Rev orchestrates assembly of the Rev-Rev response element complex." eLife **3**: e04120.

Jeong, H., Cho, M.H., Park, S.G., Jung G.(2014). "Interaction between nucleophosmin and HBV core protein increases HBV capsid assembly." FEBS Letters **588**: 851-858

Johnston, P. B., Dubay, J.W., Hunter, E.(1993). "Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells." Journal of Virology **67**(6): 3077-3086.

Kalab, P., Weis, K., Heald, R.(2002). "Visualization of a Ran-GTP Gradient in Interphase and Mitotic Xenopus Egg Extracts." Science **295**(5564): 2452.

Kalvatchev, Z., Walder, R., Perez, F., Garzaro, D., Barrios, M. (1998). "Infection of rabbits with R29 strain of bovine immunodeficiency virus: virulence, immunosuppression, and progressive mesenteric lymphadenopathy." Viral Immunology **11**: 159-166.

Kenyon, J.C., Lever, A.M.L. (2011). "The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV)." Viruses. 3(11): 2192-2213.

Kerppola, T. K. (2008). " Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells." Annual review of biophysics **37**: 465-487.

Kertayadna, G, et al. (1993). "Characteristics of a retrovirus associated with Jembrana disease in Bali cattle. ." Journal of General Virology **74**(9): 1765-1778.

Kırlı, K., et al. (2015). "A deep proteomics perspective on CRM1-mediated nuclear export and nucleocytoplasmic partitioning." eLife **4**: e11466.

Kiyomasu, T., et al.(1991). "Identification of feline immunodeficiency virus rev gene activity." Journal of Virology **65**: 4539-4542.

Kobe, B. (1999). "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α ." Nature Structural Biology **6**: 388.

Kodama, Y. and C.D. Hu (2010). "An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio." Biotechniques **49**(5): 793-805.

Köhler, M., et al. (1997). "Cloning of two novel human importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family." FEBS Letters **417**(1): 104-108.

Köhler, M., et al. (1999). "Evidence for Distinct Substrate Specificities of Importin α Family Members in Nuclear Protein Import." Molecular and Cellular Biology **19**(11): 7782-7791.

Kosugi, S., et al.(2009). "Six classes of nuclear localization signals specific to different binding groove of importin alpha." Journal of Biological Chemistry **284**: 478-485.

Krebs, F.C., Hogan, T.H., Quiterio, S.J., Gartner, S., Wigdahl, B. (2001). "Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis." In: HIV Sequence Compendium 2001. Kuiken, C.L., Foley, B., Hahn, B., Korber, B., McCutchan, F., Marx, P.A., Mellors, J.W., Sodroski, J., Wolinsky, S. (eds). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, NM, pp 1–42.

Krummheuer, J., Lenz, C., Kammler, S., Scheid, A, Schaal, H. (2001). "Influence of the Small Leader Exons 2 and 3 on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression." Virology **286**(2): 276-289.

Kubota S and R.J. Pomerantz (2000). "The nuclear function of the nuclear diffusion inhibitory signal of human immunodeficiency virus type 1: critical roles in dominant nuclear localization and intracellular stability." Journal of Human Virology **3**(4): 173-181.

Kubota, S. and R. J. Pomerantz (1998). "A cis-acting peptide signal in human immunodeficiency virus type I Rev which inhibits nuclear entry of small proteins." Oncogene **16**: 1851.

Kubota S, Siomi, H., Satoh, T., Endo, S., Maki, M., Hatanaka, M. (1989). "Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. ." Biochemical and Biophysical Research Communications **162**: 963-970.

Kudo, N., et al. (1998). "Leptomycin B Inhibition of Signal-Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1." Experimental Cell Research **242**(2): 540-547.

Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Görlich, D. (1997). "Export of Importin α from the Nucleus Is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor." Cell **90**(6): 1061-1071.

la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S. (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Engineering, Design and Selection **17**(6): 527-536.

LaCasse, E. C. and Y. A. Lefebvre (1995). "Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins." Nucleic Acids Research **23**(10): 1647-1656.

Lam, Y. W. and A. I. Lamond (2006). Chapter 15 - Isolation of Nucleoli. Cell Biology (Third Edition). J. E. Celis. Burlington, Academic Press: 103-107.

Lange, A., McLane, L.M., Mills, R.E., Devine, S.E., Corbett, A.H. (2010). "Expanding the Definition of the Classical Bipartite Nuclear Localization Signal." Traffic **11**(3): 311-323.

Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. ." Journal of Biological Chemistry **282**: 5101-5105.

Le, S. Y., Malim, M.H., Cullen, B.R., Maizel, J.V. (1990). "A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency viruses." Nucleic Acids Research **18**(6): 1613-1623.

Lee, B. J., et al. (2006). "Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by Karyopherin β 2." Cell **126**(3): 543-558.

Lee, J.-H., Culver, G., Carpenter, S., Dobbs, D. (2008). "Analysis of the EIAV Rev-Responsive Element (RRE) Reveals a Conserved RNA Motif Required for High Affinity Rev Binding in Both HIV-1 and EIAV." PLoS ONE **3**(6): e2272.

Lee, J.H., et al.(2006). "Characterization of functional domains of equine infectious anemia virus Rev suggests a bipartite RNA-binding domain. ." Journal of Virology **80**: 3844-3852.

Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S.M., Stewart, M. (2005). "Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP." Nature **435**: 693.

Lerner, D. L., Grant, C.K., de Parseval, A., Elder, J.H. (1998). "FIV infection of IL-2-dependent and -independent feline lymphocyte lines: Host cells range distinctions and specific cytokine upregulation." Veterinary Immunology and Immunopathology **65**(2): 277-297.

Lesnik, E., Sampath, R., Ecker, D.J. (2002). "Rev response elements (RRE) in lentiviruses: an RNAMotif algorithm-based strategy for RRE prediction." Medicinal Research Reviews **22**(6): 617-636.

Levin, A., et al. (2010). "A novel role for the viral Rev protein in promoting resistance to superinfection by human immunodeficiency virus type 1." Journal of General Virology **91**(6): 1503-1513.

Levin, A., Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Friedler, A., Loyter, A. (2010). "Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral Rev and cellular LEDGF/p75 proteins." Molecular Medicine **16**(1-2): 34-44.

Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., Zhao, R.Y. (2005). "Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions." Cell Research **15**: 923.

Li, R., et al. (2004). "Dimerization of the Transmembrane Domain of Integrin α IIb Subunit in Cell Membranes." Journal of Biological Chemistry **279**(25): 26666-26673.

Lischka, P., Sorg, G., Kann, M., Winkler, M., Stamminger, T. (2003). "A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin alpha/beta pathway". Journal of Virology **77**:3734-3748.

Lymberopoulos, M.H., Bourget, A., Ben Abdeljelil, N., Pearson, A. (2011). "Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress." Virology **412**: 341-348.

Madore, S. J., Tiley, L.S., Malim, M.H., Cullen, B.R. (1994). "Sequence Requirements for Rev Multimerization in Vivo." Virology **202**(1): 186-194.

Magin, C., Hesse, J., Löwer, J., Löwer, R. (2000). "Corf, the Rev/Rex Homologue of HTDV/HERV-K, Encodes an Arginine-Rich Nuclear Localization Signal That Exerts a trans-Dominant Phenotype When Mutated." Virology **274**(1): 11-16.

Mahy, B. W. J. (2009). The Dictionary of Virology. Burlington, MA, USA, Academic Press.

Mai, R.T. et al. (2006). "Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression." Oncogene **25**: 448-462.

Malik-Soni, N. and L. Frappier. (2014). "Nucleophosmin contributes to the transcriptional activation function of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein." Journal of Virology **88**: 2323-2326.

Malim, M. H. and B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: Implications for HIV-1 latency." Cell **65**(2): 241-248.

Mancuso, V. A., Hope, T.J., Zhu, L., Derse, D., Phillips, T., Parslow, T.G. (1994). "Posttranscriptional effector domains in the Rev proteins of feline immunodeficiency virus and equine infectious anemia virus." Journal of Virology **68**(3): 1998-2001.

Marasco, W.A., et al. (1994). "Spatial association of HIV-1 tat protein and the nucleolar transport protein B23 in stably transfected Jurkat T-cells." Archives of Virology **139**: 133-154.

Marchand, C. (2015). "Caractérisation du domaine de multimérisation de la protéine rev du virus de l'immunodéficience bovine." Département des Sciences Biologiques. Montréal (Québec, Canada), Université du Québec à Montréal.

Marchand, C., Lemay, G., Archambault, D. (2019). "The Jembrana disease virus Rev protein: Identification of nuclear and novel lentiviral nucleolar localization and nuclear export signals". PLoS One **14**(8):e0221505.

Marfori, M., et al. (2011). "Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization." Biochimica et Biophysica Acta **1813**(9): 1562-1577.

Mariani, R., et al. (2003). "Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1 Virions by Vif." Cell **114**(1): 21-31.

Martarano, L., Stephens, R., Rice, N., Derse, D. (1994). "Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing." Journal of Virology **68**(5): 3102-3111.

Martin, S.J., O'Neill, T.P., Bilello, J.A., Eiseman, J.L. (1991). "Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves." Immunology Letters **27**: 81-84.

Martin, R.M., et al. (2015). "Principles of protein targeting to the nucleolus". Nucleus **6**:314–325.

Mayer, J., et al. (2004). "Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity." Virology **322**(1): 190-198.

McCloskey, R., Menges, C., Friedman, A., Patel, D., McCance, D.J. (2010). "Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation." Journal of Virology **84**: 5131-5139.

McLinton, E.C., et al. (2017). "Nuclear localization and secretion competence are conserved among henipavirus matrix proteins". Journal of General Virology **98**: 563-576.

McNab, T., et al. (2010). "Prior bovine immunodeficiency virus infection does not inhibit subsequent superinfection by the acutely pathogenic Jembrana disease virus." Virology **404**(2): 261-268.

Meas, S., et al. (1998). "Seroprevalence and Field Isolation of Bovine Immunodeficiency Virus." Journal of Veterinary Medical Science **60**(11): 1195-1202.

Meyer, B. E., Meinkoth, J.L., Malim, M.H. (1996). "Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals." Journal of Virology **70**(4): 2350-2359.

Miller, C., Abdo, Z., Ericsson, A., Elder, J., VandeWoude, S. (2018). "Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis." Viruses **10**(4): 206.

Miyamoto, Y., et al. (2002). "Importin α can migrate into the nucleus in an importin β - and Ran-independent manner." The EMBO Journal **21**(21): 5833-5842.

Miyamoto, Y., Yamada, K., Yoneda, Y. (2016). "Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions." The Journal of Biochemistry **160**(2): 69-75.

Miyazaki, Y., Nosaka, T., Hatanaka, M. (1996). "The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23." Biochimie **78**: 1081-1086.

Miyazawa, T., et al. (1989). "Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus." Archives of Virology **108**(1): 131-135.

Mohammadi, H., Sharif, S., Rowland, R.R., Yoo, D. (2009). "The lactate dehydrogenase-elevating virus capsid protein is a nuclear–cytoplasmic protein." Archives of Virology **154**(7): 1071-1080.

Mohr, D., Frey, S., Fisher, T., Güttler, T., Görlich, D. (2009). "Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes." The EMBO Journal **28**(17): 2541-2553.

Molina, R. P., et al. (2002). "Mapping of the Bovine Immunodeficiency Virus Packaging Signal and RRE and Incorporation into a Minimal Gene Transfer Vector." Virology **304**(1): 10-23.

Mosammaparast, N. and L. F. Pemberton (2004). "Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators." Trends in Cell Biology **14**(10): 547-556.

Muro, E., Hoang, T.Q., Jobart-Malfait, A., Hernandez-Verdun, D. (2008). "In nucleoli, the steady state of nucleolar proteins is leptomycin B-sensitive." Biology of the Cell **100**(5): 303-313.

Musinov, a Y.R., Lisitsyna, O.M., Golyshev, S.A., Tuzhikov, A.I., Polyakov, V.Y., Sheval, E.V. (2011). "Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions." Biochimica et Biophysica Acta **1813**(1): 27-38.

Nakagaki, K., et al. (2001). "CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes." Journal of NeuroVirology **7**(5): 487-492.

Nakielny, S., et al. (1996). "Transportin: Nuclear Transport Receptor of a Novel Nuclear Protein Import Pathway." Experimental Cell Research **229**(2): 261-266.

Narayan, O. and J. E. Clements (1989). "Biology and Pathogenesis of Lentiviruses." Journal of General Virology **70**(7): 1617-1639.

Nguyen Ba, A. N., Pogouste, A., Provart, N., Moses, A.M. (2009). "NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction." BMC Bioinformatics **10**: 202-202.

Nitahara-Kasahara, Y., et al. (2007). "Novel Nuclear Import of Vpr Promoted by Importin α Is Crucial for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Macrophages." Journal of Virology **81**(10): 5284-5293.

Nouri, K., et al. (2015). "Biophysical Characterization of Nucleophosmin Interactions with Human Immunodeficiency Virus Rev and Herpes Simplex Virus US11." PLoS ONE **10**(12): e0143634.

Nuovo, G. J., de Andrade, C.V., Thirukkumaran, C., Nicol, A.F. (2018). "Importin- β and exportin-5 are indicators of acute viral infection: Correlation of their detection with commercially available detection kits." Annals of Diagnostic Pathology **34**: 36-41.

Oberste, M.S., Greenwood, J.D., Gonda, M.A. (1991). "Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative rev and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus." Journal of Virology **65**: 3932-3937.

Oberste, M. S., et al. (1993). "Characterization of bovine immunodeficiency virus rev cDNAs and identification and subcellular localization of the Rev protein." Journal of Virology **67**(11): 6395-6405.

Olsen, H. S., Cochrane, A.W., Dillon, P.J., Nalin, C.M., Rossen, C.A. (1990). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids." Genes & Development **4**(8): 1357-1364.

Onuma, M., et al. (1992). "Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom **5**: 1009-1015.

Otero, G. C., Harris, M.E., Donello, J.E., Hope, T.J. (1998). "Leptomycin B Inhibits Equine Infectious Anemia Virus Rev and Feline Immunodeficiency Virus Rev Function but Not the Function of the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element." Journal of Virology **72**(9): 7593-7597.

Ozgul, S., von Daake, S., Kakehi, S., Sereni, D., Denissova, N., Hanlon, C. (2019). "An ELISA-based screening platform for ligand-receptor discovery." Methods in Enzymology. 615, 453–475.

Passos-Castilho, A. M., Marchand, C., Archambault, D. (2018). "B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication." Virology **515**: 158-164.

Patel, S. S., Belmont, B.J., Sante, J.M., Rexach, M.F. (2007). "Natively Unfolded Nucleoporins Gate Protein Diffusion across the Nuclear Pore Complex." Cell **129**(1): 83-96.

Patenaude, A.-M., et al. (2009). "Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase." Nature Structural & Molecular Biology **16**: 517.

Pecon-Slattey, J., Troyer, J.L., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., 2008. "Evolution of feline immunodeficiency virus in Felidae: implications for human health and wildlife ecology." Veterinary Immunology and Immunopathology **123**(1-2): 32-44.

Pedersen, N. C., et al. (1987). "Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome." Science **235**(4790): 790.

Pedersen, N. C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1989). "Feline immunodeficiency virus infection." Veterinary Immunology and Immunopathology **21**(1): 111-129.

Phillips, T. R., et al. (1992). "Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus." Journal of Virology **66**(9): 5464-5471.

Phillips, T. R., et al. (1990). "Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus." Journal of Virology **64**(10): 4605-4613.

Planes, R, BenMohamed, L, Leghmari, K, Delobel, P, Izopet, J, Bahraoui, E. (2014). "HIV-1 Tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha- and Toll-like receptor 4-mediated mechanisms". Journal of Virology **88**:6672–6689.

Pollard, V. and M. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." Annual Review of Microbiology **52**: 491-532.

Popken, P., Ghavami, A., Onck, P.R., Poolman, B., Veenhoff, L.M. (2015). "Size-dependent leak of soluble and membrane proteins through the yeast nuclear pore complex." Molecular Biology of the Cell.**26**:1386–1394.

Popov, S., et al. (1998). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." The EMBO Journal **17**:909-917.

Pumroy, R. A. and G. Cingolani (2015). "Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states." The Biochemical journal **466**(1): 13-28.

Pumroy, R. A., Ke, S., Hart, D.J., Zachariae, U., Cingolani, G. (2015). "Molecular determinants for nuclear import of Influenza A PB2 by importin α isoforms 3 and 7." Structure **23**(2): 374-384.

Qin, F.X., et al. (2011). "Knockdown of NPM1 by RNA interference inhibits cells proliferation and induces apoptosis in leukemic cell line." International Journal of Medical Sciences **8**: 287-294.

Radu, A., Blobel, G., Moore, M.S. (1995). "Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(5): 1769-1773.

Rawlinson, S. M. and G. W. Moseley (2015). "The nucleolar interface of RNA viruses." Cellular Microbiology **17**(8): 1108-1120.

Reid S.P., et al. (2006). "Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha-1 and blocks STAT1 nuclear accumulation." Journal of Virology **80**:5156-5167
Ribbeck, K. and D. Görlich (2002). "The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion." The EMBO Journal **21**(11): 2664-2671.

Riddick, G. and I. G. Macara (2007). "The adapter importin- α provides flexible control of nuclear import at the expense of efficiency." Molecular Systems Biology **3**: 118.

Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., Dingwall, C. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence". Cell **64**: 615–623.

Rogers, A. B., Mathiason, C.K., Hoover, E.A. (2002). "Immunohistochemical Localization of Feline Immunodeficiency Virus Using Native Species Antibodies." The American Journal of Pathology **161**(4): 1143-1151.

Romanelli, M. and C. Morandi (2002). "Importin alpha binds to an unusual bipartite nuclear localization signal in the heterogeneous ribonucleoprotein type I." European Journal of Biochemistry **269**: 2727-2734.

Rosin-Arbesfeld, R., Yaniv, A., Gazit, A. (2000). "Suboptimal splice sites of equine infectious anaemia virus control Rev responsiveness." Journal of General Virology **81**(5): 1265-1272.

Rout, M. P., Blobel, G., Aitchison, J.D. (1997). "A Distinct Nuclear Import Pathway Used by Ribosomal Proteins." Cell **89**(5): 715-725.

Salveti, A. and A. Greco (2014). "Viruses and the nucleolus: The fatal attraction." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1842**(6): 840-847.

Samad, M.A., Okuwaki, M., Haruki, H., Nagata, K. (2007). "Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins." FEBS Letters **581**: 3283-3288.

Samad, M.A., Komatsu, T., Okuwaki, M., Nagata, K. (2012). "B23/nucleophosmin is involved in regulation of adenovirus chromatin structure at late infection stages, but not in virus replication and transcription." Journal of General Virology **93**: 1328-1338.

- Satkunanathan, S., Thorpe, R. Zhao, Y. (2017). "The function of DNA binding protein nucleophosmin in AAV replication." Virology **510**: 46-54.
- Schatz, O., et al. (1998). "Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(4): 1607.
- Schoborg, R. V. and J. E. Clements (1996). "Definition of the RRE Binding and Activation Domains of the Caprine Arthritis Encephalitis Virus Rev Protein." Virology **226**(1): 113-121.
- Schröfelbauer, B., Yu, Q., Zeitlin, S.G., Landau, N.R. (2005). "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Induces the Degradation of the UNG and SMUG Uracil-DNA Glycosylases." Journal of Virology **79**(17): 10978-10987.
- Scott, M. S., Boisvert, F.M., McDowall, M.D., Lamond, A.I., Barton, G.J. (2010). "Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences." Nucleic Acids Research **38**(21): 7388-7399.
- Setiyaningsih, S., Desport, M., Stewart, M.E., Hartaningsih, N., Wilcox, G.E. (2008). "Sequence analysis of mRNA transcripts encoding Jembrana disease virus Tat-1 in vivo." Virus Research **132**(1-2):220-225.
- Shida, H. (2012). "Role of Nucleocytoplasmic RNA Transport during the Life Cycle of Retroviruses." Frontiers in Microbiology **3**: 179.
- Siliciano, J. D., et al. (2003). "Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells." Nature Medicine **9**: 727.
- Sloan, E. A., et al. (2013). "Limited Nucleotide Changes in the Rev Response Element (RRE) during HIV-1 Infection Alter Overall Rev-RRE Activity and Rev Multimerization." Journal of Virology **87**(20): 11173.
- Snider, T. G., et al. (2003). "Natural bovine lentiviral type 1 infection in Holstein dairy cattle. I. Clinical, serological, and pathological observations." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **26**(2): 89-101.
- Soderholm, J. F., et al. (2011). "Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β ." ACS Chemical Biology **6**(7): 700-708.
- Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G., Wilcox, G.E. 1990). "Studies of Experimental Jembrana Disease in Bali Cattle. I. Transmission and Persistence of the Infectious Agent in Ruminants and Pigs, and Resistance of Recovered cattle to Re-infection." Journal of Comparative Pathology **103**(1): 49-59.
- Soeharsono, S., et al. (1995). "The transmission of Jembrana disease, a lentivirus disease of *Bos javanicus* cattle." Epidemiology and Infection **115**(2): 367-374.

Soesanto, M., et al. (1990). "Studies on Experimental Jernbrana Disease in Bali Cattle. 11. Clinical Signs and Haematological Changes." Journal of Comparative Pathology **103**(1): 61-71.

Sparks, W. O., Dorman, K.S., Liu, S., Carpenter, S. (2008). "Naturally arising point mutations in non-essential domains of equine infectious anemia virus Rev alter Rev-dependent nuclear-export activity." Journal of General Virology **89**(4): 1043-1048.

St-Louis, M.-C., Cojocariu, M., Arcgambault, D. (2004). "The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses." Animal Health Research Reviews **5**(2): 125-143.

Stabel, J. R. and T. J. Stabel (1995). "Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA." Veterinary Immunology and Immunopathology **45**(3): 211-220.

Stevens, B. J. and H. Swift (1966). "RNA transport from nucleus to cytoplasm in chironomus salivary glands." The Journal of Cell Biology **31**(1): 55-77.

Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**(3): 195-208.

Stewart, M. E., Desport, M., Setiyaningsih, S., Hartaningsih, N., Wilcox, G.E.. (2008). "Analysis of Jembrana disease virus mRNA transcripts produced during acute infection demonstrates a complex transcription pattern." Virus Research **135**(2): 336-339.

Suhasini, M. and T. Reddy (2009). "Cellular Proteins and HIV-1 Rev Function." Current HIV Research **7**(1): 91-100.

Summers, J. and W.S. Mason (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate". Cell **29**:403-415.

Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R.Y.Y., Fujita, D.J., Riabowol, K.. (2010). "REAP: A two minute cell fractionation method." BMC Research Notes **3**(1): 294.

Szebeni, A., et al. (1997). "Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin." Biochemistry **36**(13): 3941-3949.

Talcott, B. and M. S. Moore (1999). "Getting across the nuclear pore complex." Trends in Cell Biology **9**(8): 312-318.

Tan, W., et al. (1996). "Inhibitory activity of the equine infectious anemia virus major 5' splice site in the absence of Rev." Journal of Virology **70**(6): 3645-3658.

Tang, H., Kuhen, K.L., Wong-Staal, F. (1999). "Lentivirus Replication and Regulation." Annual Review of Genetics **33**(1): 133-170.

- Tejomurtula, J., Lee, K.B., Tripurani, S.K., Smith, G.W., Yao, J. (2009). "Role of Importin Alpha8, a New Member of the Importin Alpha Family of Nuclear Transport Proteins, in Early Embryonic Development in Cattle." Biology of Reproduction **81**(2): 333-342.
- Telesnitsky, A. (2010). "Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis". Future Virology **5**(5):539-543.
- Tenaya, I. W. Heel, K., Stumbles, P.A., Wilcox, G.E.. (2012). "Flow cytometric analysis of lymphocyte subset kinetics in Bali cattle experimentally infected with Jembrana disease virus." Veterinary Immunology and Immunopathology **149**(3): 167-176.
- Thomas, D. R., et al. (2018). "Identification of novel antivirals inhibiting recognition of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein by the Importin α/β 1 heterodimer through high-throughput screening." Antiviral Research **151**: 8-19.
- Tiley, L. S. and B. R. Cullen (1992). "Structural and functional analysis of the visna virus Rev-response element." Journal of Virology **66**(6): 3609-3615.
- Timney, B. L., et al. (2016). "Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex." The Journal of Cell Biology.
- Tobin, G.J., Ennis, W.H., Clanton, D.J., Gonda, M.A. (1996). "Inhibition of bovine immunodeficiency virus by anti-HIV-1 compounds in a cell culture-based assay." Antiviral Research **33**: 21-31.
- Tomonaga, K. and T. Mikami (1996). "Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes." Journal of General Virology **77**(8): 1611-1621.
- Tomonaga, K., et al. (1993). "Feline immunodeficiency virus gene expression: analysis of the RNA splicing pattern and the monocistronic rev mRNA." Journal of General Virology **74**(11): 2409-2417.
- Tsuda, Y., et al. (2006). "Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication." Microbiology and Immunology **50**: 225-234.
- Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., Yoneda, Y. (1997). "Identification of novel homologues of mouse importin α , the α subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression." FEBS Letters **416**(1): 30-34.
- Umunnakwe, C. N., Dorman, K.S., Dobbs, D., Carpenter, S. (2017). "Identification of a homogenous structural basis for oligomerization by retroviral Rev-like proteins." Retrovirology **14**(1): 40.

Umunnakwe, C. N., et al. (2014). "Computational modeling suggests dimerization of equine infectious anemia virus Rev is required for RNA binding." Retrovirology **11**: 115.

VanDerMaaten, M., Boothe, A.D., Seger, C.L. (1972). "Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis." Journal of the National Cancer Institute **49**(6): 1649-1657.

Veazey, R. S., et al. (2000). "Identifying the Target Cell in Primary Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection: Highly Activated Memory CD4(+) T Cells Are Rapidly Eliminated in Early SIV Infection In Vivo." Journal of Virology **74**(1): 57.

Vértessy, B. G. and J. Tóth (2009). "Keeping Uracil Out of DNA: Physiological Role, Structure and Catalytic Mechanism of dUTPases." Accounts of chemical research **42**(1): 97-106.

Voronin, N., Herzig, E., Hizi, A. (2014). "The dUTPase-related gene of bovine immunodeficiency virus is critical for viral replication, despite the lack of dUTPase activity of the encoded protein." Retrovirology **11**: 60.

Wagstaff, K. M. and D. A. Jans (2009). "Importins and Beyond: Non-Conventional Nuclear Transport Mechanisms." Traffic **10**(9): 1188-1198.

Wareing, S., Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Penhale, W. J.(1999). "Evidence for immunosuppression associated with Jembrana disease virus infection of cattle." Veterinary Microbiology **68**(1): 179-185.

Watts, N. R., et al. (2000). "HIV-1 Rev Depolymerizes Microtubules to Form Stable Bilayered Rings." The Journal of Cell Biology **150**(2): 349-360.

Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S... (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." Cell **82**(3): 463-473.

Weng, Z., Zhao, Q. (2015) "Utilizing ELISA to Monitor Protein-Protein Interaction." In: Meyerkord C., Fu H. (eds) Protein-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology, vol 1278. Humana Press, New York, NY. pp 341-352.

Whetstone, C.A., VanDerMaaten, M.J., Miller, J.M. (1991). "A western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimentally inoculated cattle, sheep, and goats." Archives of Virology **116**(1-4): 119-131.

Wilcox, G. E., et al. (1992). "Evidence for a viral aetiology of Jembrana disease in Bali cattle." Veterinary Microbiology **33**(1): 367-374.

Wodrich H., Kräusslich, H.G. (2001). Nucleocytoplasmic RNA Transport in Retroviral Replication. In: Richter D. (eds) Cell Polarity and Subcellular RNA Localization. Results and Problems in Cell Differentiation, vol 34. Springer, Berlin, Heidelberg.

Xu, D., Farmer, A., Collett, G., Grishin, N. V., & Chook, Y. M. (2012). "Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database". Molecular biology of the cell **23**(18): 3677–3693.

Yachdav, G., et al. (2014). "PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features." Nucleic Acids Research **42**(Web Server issue): W337-W343.

Yamada, E., et al. (2016). "A naturally occurring bovine APOBEC3 confers resistance to bovine lentiviruses: implication for the co-evolution of bovids and their lentiviruses." Scientific Reports **6**: 33988.

Yamamoto, J. K., et al. (1991). "Development of IL-2 Independent Feline Lymphoid Cell Lines Chronically Infected with Feline Immunodeficiency Virus: Importance for Diagnostic Reagents and Vaccines." Intervirology **32**(6): 361-375.

Yamamoto, J.K., et al. (1988). "Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats." American Journal of Veterinary Research **49**(8): 1246-1258.

Yang, B., et al. (2003). "Potent Suppression of Viral Infectivity by the Peptides That Inhibit Multimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vif Proteins." The Journal of biological chemistry **278**(8):6596-6602.

Yang, J., et al. (1999). "An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(23):13404-13408.

Yao, X., et al. (2010). "A quantitative assay for measuring of bovine immunodeficiency virus using a luciferase-based indicator cell line." Virologica Sinica **25**: 137-144.

Yasuhara, N., et al. (2013). "Importin Alpha Subtypes Determine Differential Transcription Factor Localization in Embryonic Stem Cells Maintenance." Developmental Cell **26**(2): 123-135.

Yi, R., Bogerd, H.P., Cullen, B.R. (2002). "Recruitment of the Crm1 Nuclear Export Factor Is Sufficient To Induce Cytoplasmic Expression of Incompletely Spliced Human Immunodeficiency Virus mRNAs." Journal of Virology **76**(5): 2036-2042.

Zapp, M., Hope, T.J., Parslow, T.G., Green, M.R.. (1991). "Oligomerization and RNA Binding Domains of the Type 1 Human Immunodeficiency Virus Rev Protein: A Dual Function for an Arginine-Rich Binding Motif." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(17): 7734-7738.

Zhang, W., et al. (2015). "Morphology and ultrastructure of retrovirus particles." AIMS biophysics **2**(3): 343-369.

Zhou, X., et al. (2013). "DDX5 Facilitates HIV-1 Replication as a Cellular Co-Factor of Rev." PLoS ONE **8**(5): e65040.

Zienkiewicz, J., Armitage, A., Hawiger, J. (2013). "Targeting nuclear import shuttles, importins/karyopherins alpha by a peptide mimicking the NFκB1/p50 nuclear localization sequence". Journal of the American Heart Association **2**: e000386.

Annexe A: La protéine B23/nucléophosmine interagit avec la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine et facilite la réplication virale.

L'objectif de ce chapitre était de déterminer si la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (VIB) était capable d'interagir avec la protéine nucléolaire B23. L'importance de cette interaction sur la réplication virale du VIB a ensuite été évaluée en utilisant des cellules dont l'expression de B23 avait été réduite via l'utilisation de petits ARN d'interférence (siRNA). Ce chapitre est présenté en annexe puisque l'étude a été réalisée avec la protéine Rev du VIB, un lentivirus possédant de fortes homologues avec le JDV à défaut de ne pas posséder de clone viral pour le JDV.

Ce chapitre présenté sous forme d'un article scientifique a été publié dans la revue « *Virology* », le 28 décembre 2017. La conception et la réalisation des expériences ont été faites par le premier auteur de l'article (Ana Maria Passos-Castilho) (70%) et par l'auteur de cette thèse (Claude Marchand) (30%). Claude Marchand a participé à la conception du projet, mis au point les expériences de CoIP, a préparé l'ADN pour les transfections et a aidé à la réalisation des expériences de western blot. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisées par le premier auteur de cet article. Le professeur Denis Archambault a contribué de manière importante à la conception du projet et la réalisation de cette étude en apportant son expertise scientifique avisée et ses commentaires judicieux et a aussi contribué au support financier. Les références de cet article apparaissent dans la section « référence » de cette thèse.

B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication.

Passos-Castilho AM, Marchand C, Archambault D.

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Virology 2018 515:158-164. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.021.

A.1. Abstract

The bovine immunodeficiency virus (BIV) Rev shuttling protein contains nuclear/nucleolar localization signals and nuclear import/export mechanisms that are novel among lentivirus Rev proteins. Several viral proteins localize to the nucleolus, which may play a role in processes that are essential to the outcome of viral replication. Although BIV Rev localizes to the nucleoli of transfected/infected cells and colocalizes with one of its major proteins, nucleophosmin (NPM1, also known as B23), the role of the nucleolus and B23 in BIV replication remains to be determined. Here, we demonstrate for the first time that BIV Rev interacts with nucleolar phosphoprotein B23 in cells. Using small interfering RNA (siRNA) technology, we show that depletion of B23 expression inhibits virus production by BIV-infected cells, indicating that B23 plays an important role in BIV replication. The interaction between Rev and B23 may represent a potential new target for the development of antiviral drugs against lentiviruses.

A.2. Introduction

Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a lentivirus of the Retroviridae family with high homology to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and other animal lentiviruses. The 8.960 kb in length BIV provirus DNA presents a typical retroviral genomic

structure containing the gag, pol, and env genes flanked by long terminal repeats at the 5' and 3' termini. Additional open reading frames in proximity to the pol-env junction encode nonstructural regulatory/accessory proteins, such as the Rev protein (Gonda et al., 1987, 1994; St-Louis et al., 2004).

Although the pathogenicity of BIV remains controversial, persistent lymphocytosis, neurological disorders, weight loss, diminished milk production, lymphoid hyperplasia, and opportunistic bacterial infections have been associated with BIV infection (Van der Maaten et al., 1972; Martin et al., 1991; Carpenter et al., 1992; Onuma et al., 1992; Brujeni et al., 2010). Interestingly, BIV-infected rabbits show symptoms similar to HIV infection (Kalvatchev et al., 1995, 1998). Furthermore, BIV cell infection can also be inhibited by HIV inhibitors, indicating that BIV and HIV share similar inhibitor targets (Tobin et al., 1996). Studies on BIV can serve, therefore, as a safe way to screen potential new targets for the development of antiviral therapeutics for more pathogenic lentiviruses (Yao et al., 2010).

The BIV Rev protein is a 23-kDa (186 amino acid [aa]-long) shuttling phosphoprotein that mediates the nuclear export of partially spliced and unspliced viral RNAs encoding structural proteins and is essential for viral replication (Oberste et al., 1991). Although both BIV and HIV-1 Rev localize to the nucleus and nucleoli of transfected/infected cells and colocalize with the nucleolar protein nucleophosmin (NPM1, also known as B23) (Oberste et al., 1993; Gomez Corredor and Archambault, 2009), we have recently demonstrated that BIV Rev is remarkably different from HIV-1 Rev. Moreover, BIV Rev contains nuclear import and export signals and mechanisms that are novel among the Rev proteins characterized so far in lentiviruses. BIV Rev has a bipartite nuclear localization signal (NLS) with an atypical 20 aa spacer sequence that contains the nucleolar localization signal (NoLS) (Gomez Corredor and Archambault, 2009) and an AMP-dependent protein kinase inhibitor-type nuclear export signal (Gomez Corredor and Archambault, 2012).

The nucleolus is the largest compartment of the cell nucleus and the most comprehensively studied nuclear domain. In addition to its well-known role as a site of rRNA transcription, processing, and assembly into ribosomal subunits, nucleoli have been

increasingly recognized as dynamic structures involved in cell cycle regulation, viral replication, and stress responses (Boisvert et al., 2007; Couté et al., 2006). Recent studies have also clearly demonstrated that several viruses induce important alterations of the nucleoli, which may have a direct role in processes that are essential for the outcome of infection, such as viral replication, virus assembly, and the control of intracellular trafficking (for reviews see references Hiscox et al., 2010; Rawlinson and Moseley, 2015).

B23 is a 37-kDa (294 aa-long), highly phosphorylated, multi-functional protein, mainly localized in the nucleoli, that participates greatly in RNA regulatory mechanisms, including transcription, ribosome assembly and biogenesis, mRNA stability, translation and microRNA processing (Colombo et al., 2011). B23 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and has been implicated in different stages of viral infection through its interaction with several viral proteins, such as HIV-1 Rev, the adenovirus/Japanese encephalitis virus/hepatitis B and C virus core, encephalomyocarditis viruses 2A and 3BCD, Newcastle disease virus M, herpes simplex virus type 1 UL24 and US11, adeno-associated virus (AAV) Rep, Epstein Barr virus (LaCasse and Lefebvre) EBNA1-3, and human papillomaviruses E6 and E7 (Aminev et al., 2003; Mai et al., 2006; Tsuda et al., 2006; Bevington et al., 2007; McCloskey et al., 2010; Lymberopoulos et al., 2011; Samad et al., 2012; Dichamp et al., 2014; Duan et al., 2014; Jeong et al., 2014; Malik-Soni and Frappier, 2014; Rawlinson and Moseley, 2015). While the exact mechanism by which B23 regulates viral replication remains unknown for some of these interactions, examples of established mechanisms include regulation of adenovirus chromatin structure at the late infection stages (Samad et al., 2012), interaction with adenovirus basic core proteins, functioning as a histone chaperone and stimulation of viral replication (Samad et al., 2007), contributions to the transcriptional activation of EBV EBNA1 (Malik-Soni and Frappier, 2014), modulation of hepatitis delta virus replication through complex formation with small HDAG (Huang et al., 2001), and enhancement of AAV replication by interaction with a G-quadruplex DNA sequence (Satkunanathan et al., 2017).

HIV-1 Rev colocalizes and interacts with B23 in the nucleolus of transfected/infected cells, and reduction of virus production has been reported in cells treated with a synthetic peptide that competes with Rev by binding B23 with high-affinity (Fankhauser et al., 1991;

Miyazaki et al., 1996; Nouri et al., 2015). However, the role of the nucleolus and one of its major proteins, B23, in BIV replication remains to be determined. Here, we demonstrate for the first time that BIV Rev interacts with the nucleolar phosphoprotein B23. Using small interfering RNA (siRNA) technology, we show that low levels of B23 impair virus production by BIV-infected cells.

A.3. Results and discussion

A.3.1. BIV Rev interacts with B23 *in vivo*

Since BIV Rev localizes mainly to the nucleolus and colocalizes with the nucleolar protein B23 (Gomez Corredor and Archambault, 2009), we wished to determine whether BIV Rev interacts with B23. To address this, we performed an immunoprecipitation (IP) assay using HEK293T cells transfected to express BIV Rev fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP). As shown in Fig. 1A, B23 co-precipitated with EGFP-BIV Rev but not with EGFP alone. Similar results were observed when BIV-permissive Cf2Th (an adherent epithelial line, derived from normal fetal canine thymus) (Bouillant et al., 1989), transformed bovine peritoneal macrophages (BoMac) (Stabel and Stabel, 1995) or Vero cells were used (data not shown).

To confirm the interaction of BIV Rev with B23, we performed reciprocal IP experiments using HEK293T cells cotransfected to express EGFP-BIV Rev and B23 fused to red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRed). EGFP-BIV Rev but not EGFP alone co-precipitated with overexpressed B23 (Fig. 1B).

These results agree with studies showing the interaction of viral proteins with B23, including HIV-1 Rev (Fankhauser et al., 1991; Hiscox et al., 2010).

A.3.2. Interaction between BIV Rev and B23 is independent of RNA

To determine the nature of the interaction between BIV Rev and B23 and to assess whether this interaction occurs through RNA intermediates, IP experiments were performed using RNase A-treated lysates from cells transfected with the EGFP-BIV Rev expression

vector. Samples treated with RNase A did not show any difference in interaction between EGFP-BIV Rev and B23 compared to the untreated samples (Fig. 1C). This result indicated that, although both BIV Rev and B23 can bind to RNA (Dumbar, 1989; Cullen, 2003), they form a specific protein-protein type interaction and that RNA is not required as a binding intermediate.

A.3.3. The BIV Rev bipartite NLS is essential and sufficient for interaction with B23

BIV Rev contains an arginine- and lysine-rich region encompassing aa 71–110, which contains a bipartite NLS and a separate NoLS (Fig. 2A). As B23 is known to bind arginine/lysine-rich domains of proteins, we hypothesized that BIV Rev interacts with B23 through this identified aa 71–110 region. Thus, to determine the region of BIV Rev required for B23 interaction, we performed an IP analysis using HEK293T cells transfected to express EGFP-BIV Rev71–110 (containing only aa 71–110) and an alanine-substitution mutant, EGFP-BIV RevK/O- NLS/NoLS, in which all arginine and lysine residues within the aa 71–101 sequence (which contains the aa composing the NLS and NoLS) have been substituted by alanine residues. IP analysis identified co-precipitation of B23 with EGFP-BIV Rev71–110 but not EGFP-BIV RevK/O- NLS/NoLS (Fig. 2B). This result correlates with the fact that, as previously shown in HEK293T cells (Gomez Corredor and Archambault, 2009), the EGFP-fused mutant BIV Rev71–110 accumulated in the nucleoli of BIV- permissive Cf2Th cells, and colocalized with B23, similarly to the EGFP- fused wild-type (WT) BIV Rev. In contrast, EGFP-BIV RevK/O-NLS/NoLS presented a diffuse cytoplasmic distribution with no accumulation in the nucleus or nucleoli (Fig. 2C). Therefore, we concluded that the region between aa 71 and 101, which contains the bipartite NLS and the NoLS, is necessary and sufficient for the interaction between BIV Rev and B23. This result is in accordance with other studies that showed the binding of B23 with arginine/lysine-rich domains of viral proteins, such as HIV-1 Rev and Tat (Fankhauser et al., 1991; Marasco et al., 1994), Newcastle disease virus matrix protein (Duan et al., 2014) and herpes simplex virus US11 (Nouri et al., 2015).

A.3.4. Multiple domains within BIV Rev bipartite NLS interact with B23

To map the binding domains between the BIV Rev NLS and B23, we performed IP analysis of HEK293T cells expressing EGFP-fused Rev half NLS deletion mutants, BIV Rev Δ 71-90 (lacking aa 71–90) and BIV Rev Δ 91-110 (lacking aa 91–110). As shown in Fig. 2C, both these mutants were excluded from the nucleus and localized solely to the cytoplasm of Cf2Th cells. Interestingly, IP analysis identified the co-precipitation of both these half NLS deletion mutants with B23 (Fig. 2B). These results suggest that both the first and second arginine/lysine-rich NLS clusters could interact with B23. Nevertheless, the impact of aa 79–80 and aa 88 residues that compose the NoLS and are part of the half NLS deletion mutants, cannot be excluded. Our results are in agreement with herpes simplex virus US11 protein, which has also been shown to possess multiple binding sites for B23 (Nouri et al., 2015).

A.3.5. Interaction between BIV Rev and B23 is independent of nucleolar localization of Rev

To investigate whether the NoLS region and the nucleolar localization of BIV Rev are essential for the interaction with B23, we performed IP analysis with HEK293T cells expressing an alanine mutant, EGFP-BIV RevK/O-NoLS in which two arginines of the NoLS at positions 79 and 80 that were essential for nucleolar localization have been substituted by alanine (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Confocal microscopy of Cf2Th cells showed that EGFP-BIV RevK/O-NoLS localizes to the nucleus but is excluded from the nucleolus (Fig. 2C). IP analysis showed that EGFP-BIV RevK/O-NoLS precipitates with B23, thus indicating that the interaction of BIV Rev with B23 is independent of the nucleolar localization of Rev (Fig. 2B). These results are in accordance with the Rev export activity, as EGFP-BIV RevK/O-NoLS has been shown to have activity comparable to that of Rev WT (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Interestingly, EGFP-BIV RevK/O-NLS/NoLS, which is excluded from the nucleus and cannot bind B23, has been shown to have no activity at all (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Taken together, these results suggest that Rev's ability to bind B23 is correlated with export activity and indicates that, in contrast to what has been demonstrated for HIV-Rev (Fankhauser et al., 1991), interaction of BIV Rev

and B23 is independent of Rev NoLS. Rather, as discussed above, the bipartite NLS seems to mediate binding to B23.

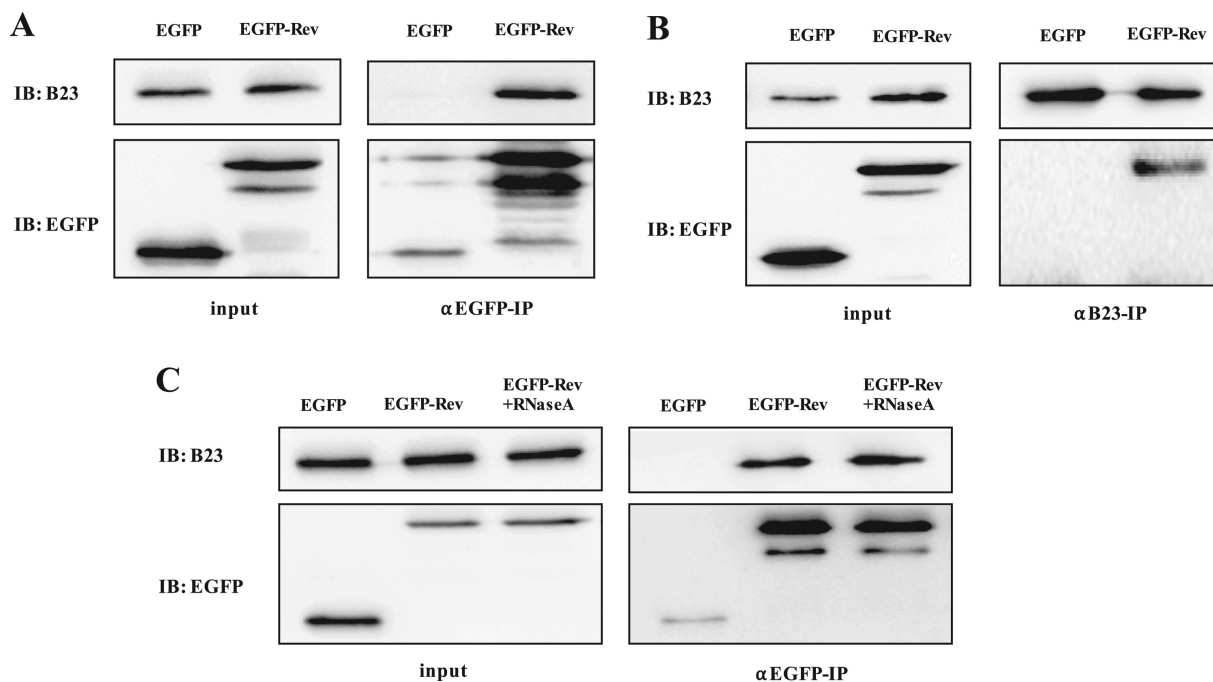


Figure A.1. BIV Rev forms specific interactions with nucleolar protein B23 in HEK293T cells.

Immunoblot (IB) of immunoprecipitation (IP) experiments using HEK293T cells transfected with EGFP or EGFP-fused BIV Rev. (A) IB of IP with αEGFP showing that endogenous B23 co-precipitates with EGFP-Rev, but not EGFP alone. (B) IB of reciprocal IP with αB23 showing that EGFP-Rev but not EGFP alone co-precipitates with B23 overexpressed in HEK293T cells (endogenous + B23-dsRed). (C) IB of IP with αEGFP showing that B23 co-precipitates with EGFP- Rev, regardless of the RNA presence in the cell lysate.

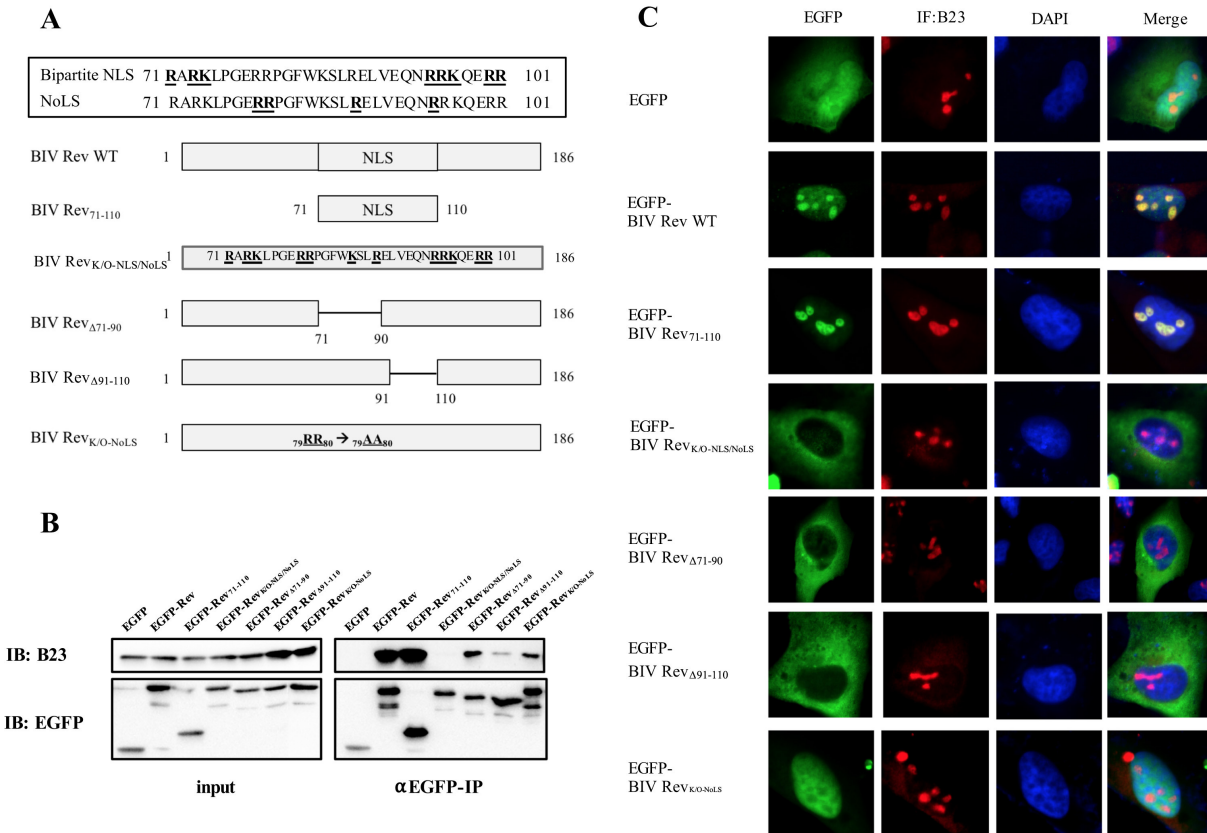


Figure A.2. The region encompassing aa 71–101 of the BIV Rev protein that contains a nuclear localization signal (NLS) and nucleolar localization signal (NoLS) is sufficient for interaction with B23.

(A) Schematic representation of BIV Rev WT, import signals and mutant constructs targeting aa 71–110. Arginine/lysine residues essential for NLS/NoLS functions are shown in bold. (B) Immunoblot (IB) of immunoprecipitation (IP) assay with αEGFP using HEK293T cells transfected with EGFP alone, EGFP-fused BIV Rev, or mutant constructs. (C) Subcellular localization of EGFP alone, EGFP-fused BIV Rev and mutant constructs targeting aa 71–110 by fluorescence microscopy in Cf2Th cells (EGFP in green, immunofluorescence (IF) with αB23 as a nucleolar marker in red, DAPI as nuclear marker in blue). The images shown are representative of the expression patterns observed in at least 75% of cells in three independent experiments.

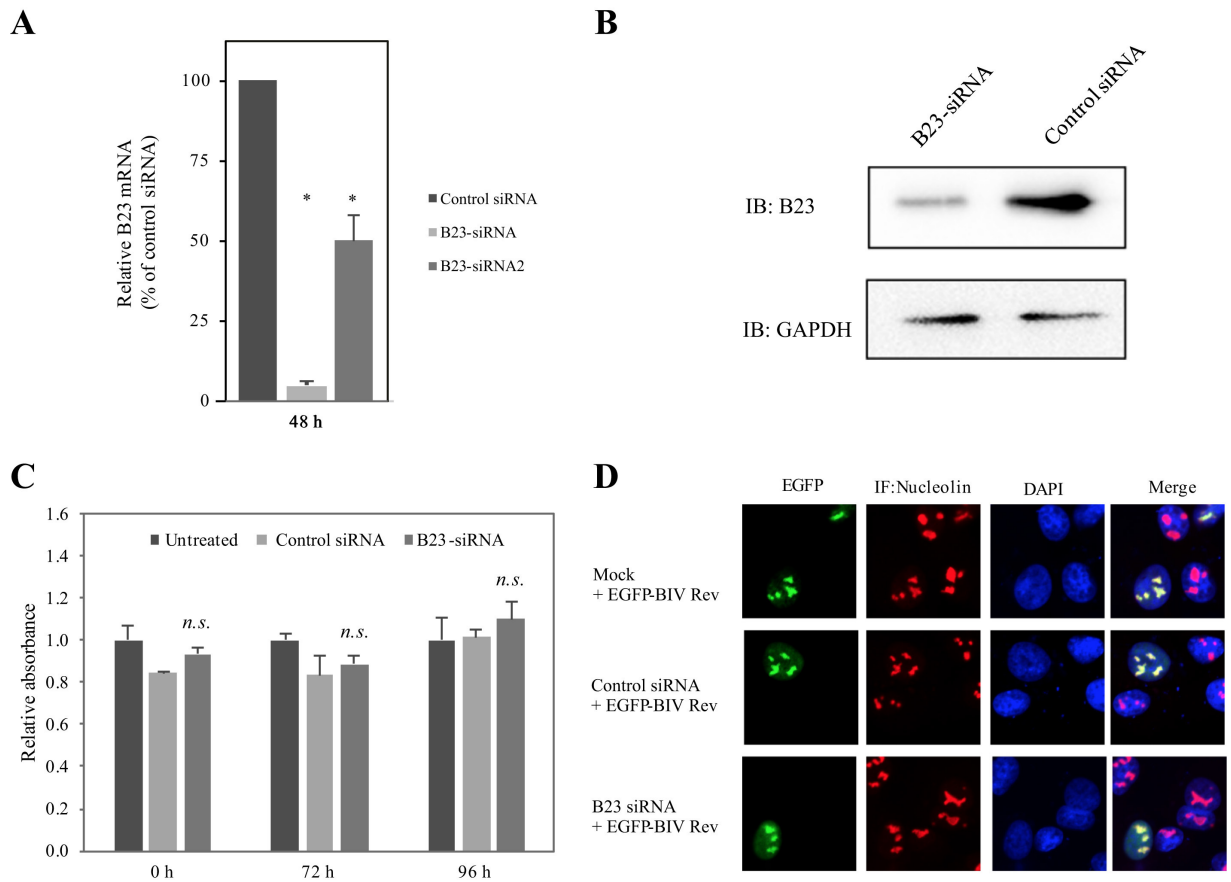


Figure A.3. B23 siRNA knockdown and BIV Rev expression.

(A) Relative B23 mRNA levels in Cf2Th cells treated with control siRNA, B23-siRNA or B23-siRNA2 for 48 h were obtained by RT- qPCR [means \pm standard deviations (Watts, Sackett et al.) from 3 independent experiments]. The level of knockdown was normalized to the level of endogenous expression in control siRNA transfected cells, set to 100%. * $P < 0.01$ compared to control siRNA. (B) Immunoblot (IB) using antibodies against B23 and GAPDH of a representative cell lysate of Cf2Th cells treated with control siRNA or B23-siRNA for 48 h. (C) MTT assays for cell viability at 0, 72 and 96 h after siRNA treatment for 48 h. Relative absorbance values of treated cells compared to untreated cells (mock), set to 1 (means \pm SD from 3 independent experiments); n.s., not significant compared to control siRNA. (D) Cell/nucleolar morphology and nuclear/nucleolar localization of BIV Rev are maintained in B23 siRNA knockdown Cf2Th cells as analyzed by fluorescence microscopy [EGFP in green, immunofluorescence (IF) with antibodies against nucleolin as a nucleolar marker in red, DAPI as nuclear marker in blue]. The images shown are representative of the expression patterns observed in at least 75% of cells in three independent experiments.

A.3.6. Knockdown of B23 in Cf2Th cells

To test the impact of B23 on BIV Rev expression and BIV replication, Cf2Th cells were first transfected with non-targeting negative control small interfering RNA (control siRNA), a targeted negative control siRNA (Fib-siRNA, to knockdown the nucleolar protein fibrillarin), or B23-targeting siRNA (B23-siRNA or B23-siRNA2). Knockdown was confirmed by quantification of the mRNA using reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). B23 was depleted by 90% and 50% after B23-siRNA and B23-siRNA2 treatment, respectively (Fig. 3A). B23-siRNA was chosen for all the subsequent B23 knockdown experiments. Fibrillarin was depleted by 93% after Fib-siRNA treatment. B23 knockdown with B23-siRNA was further confirmed by immunoblot (IB) of the cell lysates using antibodies against B23 (Fig. 3B). B23-siRNA, but not control siRNA, depleted B23 in cells while GAPDH expression was unaffected, suggesting that B23 depletion has no major effect on cell viability. The cell viability aspect was confirmed by trypan blue exclusion (data not shown) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Fig. 3C).

It has been previously shown that B23 siRNA knockdown does not cause discernable changes in cell morphology (Samad et al., 2012; Duan et al., 2014; Satkunanathan et al., 2017). In the present study, the maintenance of cell morphology and intracellular/nucleolar structure after B23 siRNA knockdown was assessed by immunofluorescence analysis of untreated (mock), control siRNA and B23-siRNA cells by confocal microscopy. As shown in Fig. 3D, the nucleolar structure, which was enlightened by the immunostaining of the nucleolar protein nucleolin in red, was unaltered regardless of the cell treatment.

A.3.7. BIV Rev localizes mainly to the nucleolus of B23 knockdown cells

We have previously demonstrated that BIV Rev colocalizes with B23 in the cell nucleolus (Gomez Corredor and Archambault, 2009). HIV-1 Rev also localizes to the nucleolus and colocalizes with B23, which in turn is necessary for the nucleolar localization of

HIV-1 Rev (Fankhauser et al., 1991; Miyazaki et al., 1995, 1996). Once HIV-1 Rev enters the nucleus, B23 facilitates the transport of HIV-1 Rev to the nucleolus (Fankhauser et al., 1991).

To test whether B23 is required for the nucleolar localization of BIV Rev, we transfected B23 knockdown cells with EGFP-BIV Rev. Interestingly, EGFP-BIV Rev localizes to the nucleus and can still localize to the nucleolus of transfected B23 knockdown Cf2Th cells (Fig. 3D), as opposed to HIV-1 Rev. Nevertheless, the role of B23 in the shuttling of BIV Rev cannot be ruled out, since nucleolar accumulation of BIV Rev seems to be reduced in B23 knockdown Cf2Th cells (Fig. 3D). It is thus tempting to hypothesize that additional nucleolar partners of BIV Rev may contribute to its shuttling and nucleolar accumulation. Further studies are underway in our laboratory to elucidate the role of additional nucleolar proteins on BIV Rev nucleolar localization.

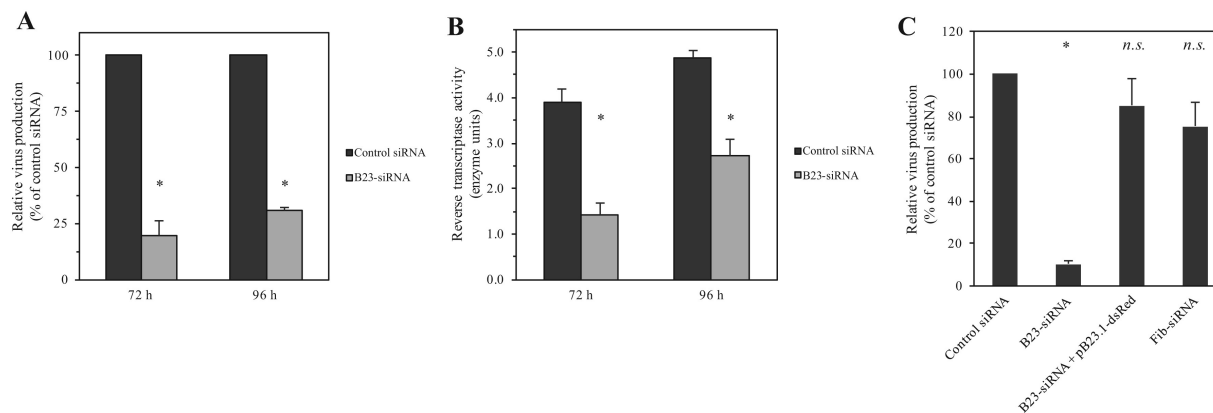


Figure A.4. B23 is required for BIV replication.

(A) Relative viral production (viral particles measured by RT-qPCR) in supernatants of Cf2Th cells transfected for 48 h with control siRNA or B23-siRNA at 72 and 96 h post-infection with BIV [means \pm standard deviations (Watts, Sackett et al.) from 3 independent experiments]. (B) Reverse transcriptase activity in supernatants of Cf2Th cells transfected for 48 h with control siRNA or B23-siRNA at 72 and 96 h post-infection with BIV (means \pm SD from 3 independent experiments). (C) Relative viral production in supernatants of Cf2Th cells transfected for 48 h with control siRNA, B23-siRNA +/- pB23.1-dsRed plasmid (2500 ng, 24 h) expressing B23 resistant to siRNA, or Fib-siRNA at 72 h post-infection with BIV. * $P < 0.01$ compared to control siRNA; n.s., not significant compared to control siRNA.

A.3.8. Knockdown of B23 results in a reduction of BIV viral titers in Cf2Th cells

To test the effect of B23 knockdown on BIV replication, BIV-permissive Cf2Th cells were transfected with siRNA on day 2 after plating, before infection with BIV (~10⁶ viral particles per infection) on day 4. B23 depletion by B23-siRNA resulted in an 80% decrease in viral load in the cell culture supernatant 72 h post infection (hpi) in comparison to that of the control siRNA (Fig. 4A). The inhibition of virus production after B23 knockdown was further confirmed by a reverse transcriptase assay, also showing a significant reduction in enzyme activity ($P < 0.01$; Student's t-test) (Fig. 4B). Together, these data indicate that B23 plays a critical role in BIV replication.

To unambiguously demonstrate that the reduction in BIV production was mediated by the absence of B23, we conducted a rescue experiment. Cf2Th cells were transfected with B23-siRNA for 48 h to knockdown endogenous B23 expression and then transfected for 24 h with the pB23.1-dsRed plasmid, which was predicted upon sequence alignment analysis to express a B23 resistant to the B23-siRNA, followed by infection with BIV. While transfecting cells with B23-siRNA decreased the relative BIV virus production by approximately 90%, co-transfection of B23-siRNA and pB23.1-dsRed successfully restored BIV production to a level similar to that of the cells transfected with control siRNA (Fig. 4C). Moreover, to further confirm the specificity of the impact of B23 knockdown on BIV production, we analyzed virus production in BIV-infected Cf2Th cells previously transfected with a targeted negative control siRNA (Fib-siRNA). The siRNA knockdown of the nucleolar protein fibrillarin did not have a significant impact on BIV viral production (Fig. 4C).

The impairment of BIV production upon B23 knockdown is consistent with the previous finding that HIV virus production is reduced in cells treated with a synthetic peptide that competes with HIV-1 Rev by binding B23 with high affinity (Nouri et al., 2015). It has been proposed that B23 acts as an auxiliary factor necessary for HIV-1 replication by facilitating the nuclear/nucleolar transport of Rev (Nouri et al., 2015). B23 has also been shown to play a role in the replication of adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes

simplex virus and Newcastle disease virus (Samad et al., 2012; Duan et al., 2014; Satkunanathan et al., 2017).

A.4. Conclusion

In conclusion, our data showed for the first time that BIV Rev forms a specific interaction with nucleolar phosphoprotein B23 and that B23 is important for BIV replication. These data provide a potential new target for the development of antiviral drugs for lentiviruses and extend the current knowledge on lentivirus biogenesis and the role of the nucleolus in viral replication.

A.5. Material and methods

A.5.1. Cell cultures and transfections

Cf2Th, HEK293T and Vero cells were grown and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone™; Multicell; Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories Inc., Canada). BoMac cells were grown and maintained likewise, but in RPMI medium (HyClone™; Multicell; Gibco, USA). For transfection, cells were incubated overnight in 6-well or 24-well plates to a cell density of approximately 80% confluence. Cells transfected for microscopy analysis were plated on coverslips. Plasmid DNA (2500 ng/well for 6-well or 500 ng/well for 24-well plates) was mixed with Lipofectamine™ 3000 reagent (Invitrogen, USA) in the presence of Opti-MEM® reduced serum medium (Life Technologies, USA) and added to cells for 24 h according to the manufacturer's instructions.

A.5.2. Plasmids and plasmid constructs

The generation of EGFP-BIV Rev, the BIV Rev mutant constructs and pB23.1-dsRed has been described elsewhere (Gomez Corredor and Archambault, 2009). The BIV plasmid, pBIV127, which contains the complete infectious proviral DNA clone of BIV (Braun et al., 1988) was used to generate infectious virus, as described below.

A.5.3. Immunoprecipitation and immunoblotting

HEK293T, Cf2Th, Vero and BoMac cells grown in 6-well plates were transfected with EGFP plasmid, EGFP-BIV Rev, or mutant constructs for 24 h, or co-transfected with EGFP or EGFP-BIV Rev and pB23.1-dsRed for reciprocal IP assays. Cells were then washed and lysed, and nuclear proteins were extracted (Suzuki et al., 2010). After centrifugation, the pooled

cytoplasmic and nuclear protein fractions in 0.1% NP-40 PBS containing 1× EDTA-free protease inhibitor (Roche, USA) were incubated with μ MACSTM Anti-GFP MicroBeads (Miltenyi Biotec, USA) for 1 h on ice. After the labeling incubation, the cell lysate was applied onto the column placed in the magnetic field. Subsequent washing and elution were performed according to the manufacturer's instructions. When specified, cell extracts were pre-incubated with RNase A (BioBasic, Canada) at 100 μ g/ml for 30 min on ice before the labeling incubation. RNase A activity control was performed by agarose gel visualization and Nanodrop quantification of total RNA extracted from RNase-free DNase I (Abcam, USA)-treated cell lysates (comparison of total RNA of cell lysates +/- RNase A treatment, which resulted in a 15-fold reduction in total RNA after RNase A treatment).

For the reciprocal anti-B23 IP, SureBeadsTM Protein G Magnetic Beads (Bio-Rad, USA) pre-incubated with an anti-B23 antibody (FC82291, Abcam, USA) were added to the lysate for 1 h before recovering the beads by centrifugation. The beads were washed 4 times with 0.1% Tween 20 in PBS and resuspended in Laemmli sample buffer. Immunoprecipitates and input samples (2% of total lysate) were analyzed by IB by using appropriate antibodies.

A.5.4. Immunofluorescence and microscopy

After a 24 h incubation, transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3) solution for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 4% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37 °C and then incubated with mouse primary anti-B23 (Abcam, USA) or rabbit anti-nucleolin antibody (Santa Cruz Biotechnologies, USA) for 1 h at 37 °C. After three washes with PBS, the cells were incubated with Texas Red®-labeled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, USA). The coverslips were then mounted on glass slides using ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies, USA) for nuclei counterstaining. Images were taken using an inverted microscope (Nikon TE-300) coupled to the confocal Bio-Rad MRC-1024ES system. All images were analyzed with ImageJ software. For each protein examined, at least 100 expressing cells were observed. Data shown are representative of the expression observed in at least 75% of cells on three independent experiments.

A.5.5. Virus production

The generation of infectious BIV has been described elsewhere (Voronin et al., 2014). Briefly, Cf2Th cells were incubated overnight in 6-well plates to a cell density of approximately 80% confluence and transfected with proviral BIV vector pBIV127 (2500 ng/well) using LipofectamineTM 3000 reagent (Invitrogen, USA) in the presence of Opti-MEM® reduced serum medium (Life Technologies, USA) for 24 h according to the manufacturer's instructions. The medium was then removed, and the cells were washed three times with PBS. At 24, 48 and 72 h after transfection, supernatants were removed, briefly centrifuged at 4 °C, filtered through a 0.4 μ m Millipore filter and stored at -80 °C. The

number of BIV particles in the supernatants was determined afterwards by RT-qPCR, as described below.

A.5.6. siRNA treatment and virus infection

B23-siRNA (Silencer® Select s9678, Invitrogen, USA), B23-siRNA2 (Silencer® Select s9677, Invitrogen, USA), Fib-siRNA (Silencer® Select s4820, Invitrogen, USA), and control siRNA (Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA, Invitrogen, USA) were transfected into low-passage Cf2Th cells (incubated in 6-well plates overnight to a confluence of approximately 70%) using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Mock siRNA treatment was performed similarly but with no siRNA. B23 knockdown efficiency was checked by RT-qPCR and IB analysis 48 h after transfection. RT- qPCR results were expressed as the means \pm standard deviation (Watts, Sackett et al.) of three independent experiments. To study the effect of B23 knockdown on BIV replication, approximately 106 viral particles were added to each well 48 h after siRNA treatment in the presence of DEAE-Dextran (10 μ g/ml, Sigma, USA). Cells were incubated for 6 h at 37 °C to allow virus adsorption. Three washes were then performed with PBS to remove unbound virus and traces of provirus plasmid. Cells were incubated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum until supernatants were collected at 72 and 96 hpi. Supernatants were then briefly centrifuged at 4 °C, filtered through a 0.4 μ m Millipore filter and stored at -80 °C. The number of BIV particles in the supernatants was analyzed afterwards by RT-qPCR, as described below.

A.5.7. MTT assay

To test the cell viability after siRNA treatment for 48 h, MTT tests were performed at the time of BIV infection (0 h), and at the times when supernatants were collected for measuring virus production (72 and 96 h after virus infection). Briefly, cells were incubated with 10 μ l of MTT at 5 mg/ml (Sigma, USA) for 1 h at 37 °C. DMSO was then added and the absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 570 nm. The results were expressed as relative absorbance values of treated cells compared to untreated cells (mock). Statistical significance ($P < 0.01$) was determined by two-tailed Student's T-test for comparison of cells treated with B23-siRNA to cells treated with control siRNA.

A.5.8. Viral RNA purification and real-time quantitative PCR analysis

Cell supernatants were treated with RNase-free DNase I (Abcam, USA) prior and post RNA extraction using a QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) to eliminate plasmid contaminations. Viral cDNA synthesis, as well as qPCR reactions using virus-specific primer sets to quantify the total number of viral particles, and backbone-specific primers used as controls to exclude possible plasmid contamination in the cDNA samples, have been described elsewhere (Voronin et al., 2014). Viral RNA was also tested using virus-specific qPCR for each sample as an additional plasmid contamination control and to check the

efficiency of DNase treatment. Additionally, for each sample, qPCR reactions using 18SrRNA-specific primers (Buchwalter and Hetzer, 2017) were performed as internal efficiency controls and for subsequent normalization of the viral loads. All reactions were carried out as technical triplicates with a non-template control. The concentration of each virus preparation was calculated based on a 10-log-fold standard curve generated with the proviral BIV vector pBIV127. Mean and SD were determined for each sample. Statistical significance ($P < 0.01$) was determined by two-tailed Student's T-test for comparison of virus production in cells treated with B23-siRNA and control siRNA. The results correspond to the average \pm SD of three independent experiments.

To test the siRNA knockdown efficiency 48 h after transfection, cells were resuspended and total RNA was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR reactions were performed as described above using B23- specific primers (Qin et al., 2011). Nucleolin-specific primers (Cong et al., 2012) were used in additional qPCR reactions for each sample to allow normalization for relative quantification, which was calculated based on a 2-fold standard curve generated with cDNA from untreated cells. The level of knockdown was normalized to the level of endogenous expression in control siRNA-transfected cells, set to 100%.

A.5.9. Reverse transcriptase assay

Reverse transcriptase activity was determined with an EnzChek Reverse Transcriptase Assay Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

A.6. Acknowledgments

A. M. Passos-Castilho and C. Marchand were supported by post-doctoral and graduate scholarships, respectively, from the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQ_NT). This work was supported by an operating Discovery grant from the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) (RGPIN-2016- 06532) of Canada to D. Archambault.

B.2. Protéines purifiées observées par coloration au bleu de Coomassie

La taille des protéines de fusion purifiées a été vérifiée sur gel par coloration au bleu de Coomassie. Les protéines Rev avec l'étiquette His ont été retrouvées au poids moléculaire attendu, soit approximativement 21 kDa pour la protéine Rev du VIB et 16 kDa pour la protéine Rev du VIH-1. Les protéines Rev du VIF et du JDV ont été retrouvées à un poids moléculaire légèrement supérieur à celui attendu, soit approximativement 25 kDa pour le VIF (attendu à 20 kDa) et 30 kDa pour le JDV (attendu à 26 kDa). Les importines couplées à la GST ont été retrouvées au poids moléculaire attendu, soit approximativement 90 kDa pour les importines α et 123 kDa pour l'importine β .

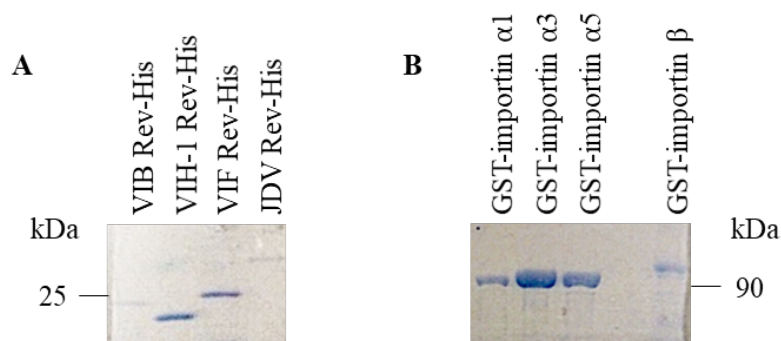


Figure B.2. Protéines recombinantes purifiées.

(A) Les protéines Rev-His ont été exprimées dans des cellules bactériennes compétentes de la souche *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3) pLysS transformées avec pET21b(+)-Rev après une induction de 4h à 37°C en présence de 1 mM d'IPTG. (B) Les protéines de fusion GST-importines α 1, α 3, α 5, et β ont été exprimées dans des cellules bactériennes compétentes de la souche *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) pLysS transformées avec les différents vecteurs pGex-importine suite à une induction de 16 h à 30°C en présence de 0.5 mM d'IPTG. Un volume de 10 μ l des différentes protéines dialysées a été déposé dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12% contenant du SDS. Après migration, les gels ont été colorés au bleu de coomassie.

La taille des protéines de fusion GST-Rev purifiées a été vérifiée sur gel par coloration au bleu de Coomassie. Les protéines Rev en fusion avec la GST ont été retrouvées au poids moléculaire attendu, soit approximativement 46 kDa pour la protéine Rev du VIB, 30 kDa pour la protéine Rev du VIH-1, 40 kDa pour la protéine Rev du VIF et 52 kDa pour la protéine Rev du JDV.

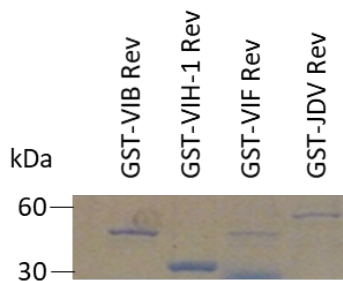


Figure B.3. Protéines Rev de différents lentivirus en fusion avec la GST purifiées.

Les protéines GST-Rev ont été exprimées dans des cellules bactériennes compétentes de la souche *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3) pLysS transformées avec pGex4T1-Rev après une induction de 4h à 37°C en présence de 1 mM d'IPTG. Un volume de 10 µl des différentes protéines dialysées a été déposé dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12% contenant du SDS. Après migration, les gels ont été colorés au bleu de coomassie.

B.3. Fractions obtenues suite à l'extraction et la purification des nucléoles.

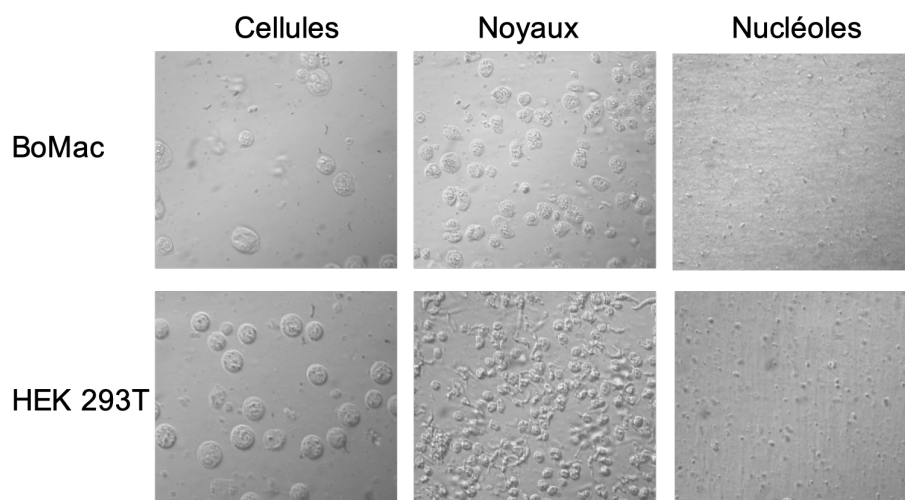


Figure B.4. Extraction nucléolaire à partir de cellules BoMac et HEK 293T.

Des cellules BoMac et HEK 293T ont été cultivées dans des pétris de 15 cm puis récoltées pour en extraire les nucléoles. Les cellules entières ont été lysées par homogénéisation puis lavées dans un gradient de glucose pour obtenir des noyaux propres. Ces noyaux ont ensuite été lysés par sonication puis lavés dans un second gradient de glucose pour obtenir des nucléoles purifiés. Les différentes fractions obtenues ont été observées au microscope à contraste de phase à un grossissement final de 400 x.

B.4. Activité croisée entre les Revs et les RREs des différents lentivirus.

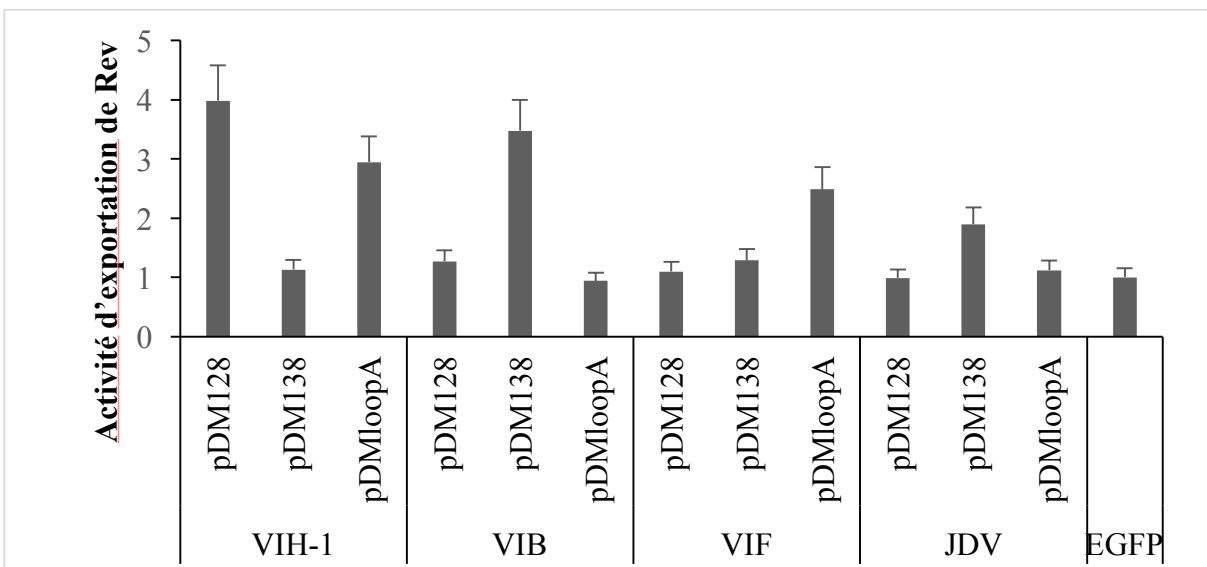


Figure B.5. Activité fonctionnelle de Rev avec différents RRE.

L'activité d'exportation nucléaire des protéines Rev a été déterminée en utilisant un test ELISA basée sur le gène rapporteur CAT. Les cellules ont été cotransfectées avec un vecteur codant pour la protéine Rev de différents lentivirus en fusion avec la EGFP et un vecteur contenant la séquence RRE du VIH-1 (pDM128), du VIB (pDM138) et du VIF (pDMloopA). 48 h suivant la transfection, les cellules ont été lysées et sujettes au CAT ELISA. L'activité Rev a été exprimée sous la forme du ratio de l'expression de CAT en présence de EGFP-Rev sur l'expression basale de CAT en présence de la EGFP uniquement.

B.5. Localisation du RRE du JDV

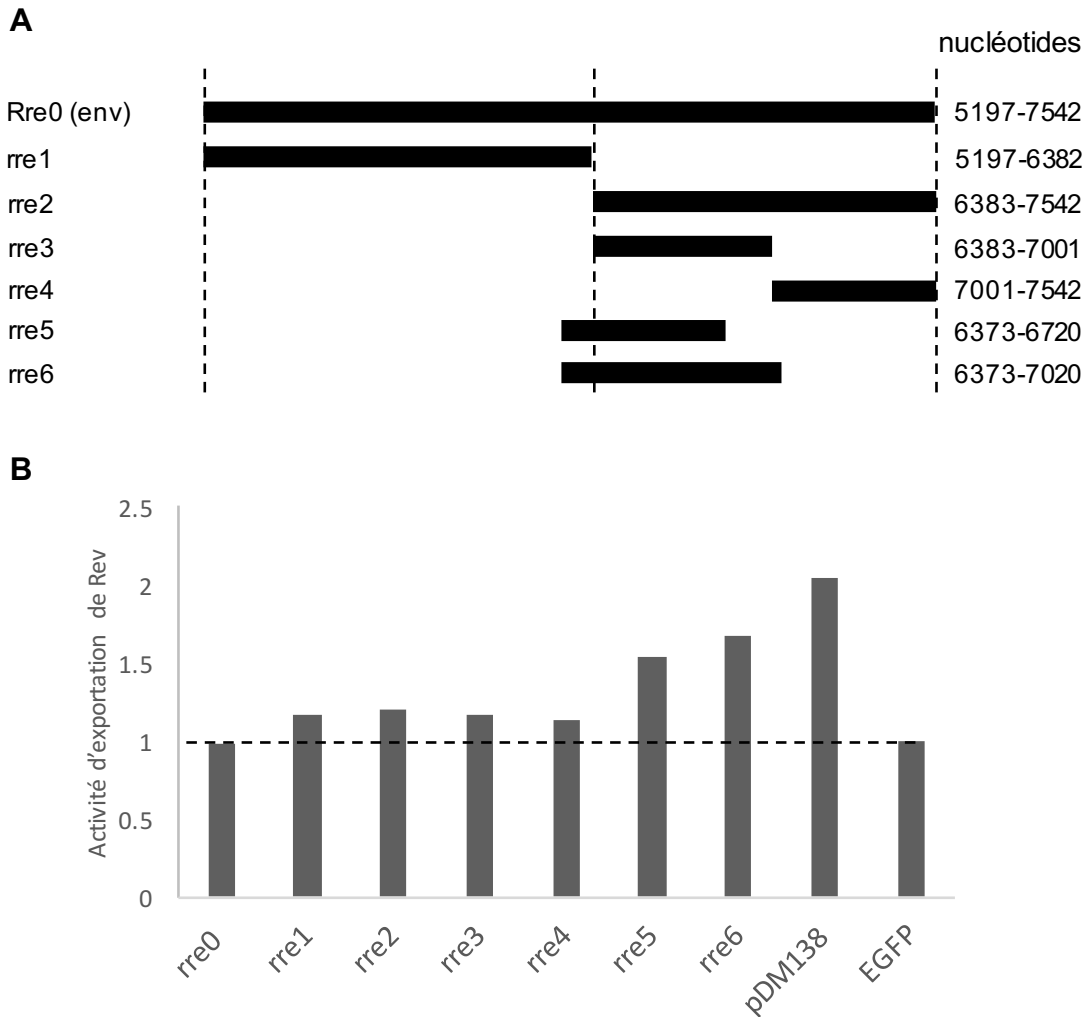


Figure B.6. Localisation du RRE du JDV

(A) Différentes séquences provenant du gène de l'enveloppe ont été clonées dans le vecteur pDM128 en remplacement du RRE du VIH-1. (B) L'activité d'exportation nucléaire de la protéine Rev du JDV a été déterminée en utilisant un test ELISA basé sur le gène rapporteur CAT. Les cellules ont été cotransfectées avec un vecteur codant pour la protéine Rev du JDV en fusion avec la EGFP et un vecteur contenant la séquence RRE du VIB (pDM138) ou une séquence test (rre0 à 6). 48 h suivant la transfection, les cellules ont été lysées et les lysats ont été utilisés dans le CAT ELISA. L'activité Rev a été exprimée sous la forme du ratio de l'expression de CAT en présence de EGFP-Rev sur l'expression basale de CAT en présence de la EGFP uniquement.

Annexe C- Séquence de la protéine Rev du VIF (petaluma)

Numéro d'accèsion Genbank : S42322.1

```
Atg gca gaa ggg ttt gca gcc aat aga caa tgg ata ggg cca gaa
M A E G F A A N R Q W I G P E
gaa gct gaa gag cta tta gat ttt gat aaa gca aca caa atg aat
E A E E L L D F D K A T Q M N
gaa gaa ggg cca cta aat cca gga gta aac cca ttt aga gta cct
E E G P L N P G V N P F R V P
Gca gta aca gaa gca gac aag caa gaa tat tgt aag ata tta caa
A V T E A D K Q E Y C K I L Q
ccc cga tta caa gag ata agg aat gaa att caa gaa gta aaa cta
P R L Q E I R N E I Q E V K L
gaa gaa gga aat gca ggt aaa atg aaa aag aaa aga caa aga aga
E E G N A G K M K K K R Q R R
aga aga aag aag aag gcc ttt aag aaa atg atg aca gat tta gaa
R R K K K A F K K M M T D L E
gac cgc ttc aga aaa cta ttc ggc tca ccc tct aaa gat gaa tac
D R F R K L F G S P S K D E Y
aca gaa att gag ata gaa gaa gac cct cct aaa aaa gaa aaa agg
T E I E I E E D P P K K E K R
gtg gac tgg gat gag tat tgg gac cct gaa gaa ata gaa aga atg
V D W D E Y W D P E E I E R M
ctt atg gac taa
L M D *
```


Annexe D – séquence Rev du JDV

Numéro d'accèsion Genbank : U21603.1

```
ATG ATG GAA GAA GGA AGA AAA GAG GAA CCA GAG GAA AGG GGA GAA AAA TCC ACT ATG
M M E E G R K E E P E E R G E K S T M

CGA GAT CTA TTA CAG AGA GCT GTG GAC AAA GGG CAC CTA ACT GCG CGT GAG GCA CTA
R D L L Q R A V D K G H L T A R E A L

GAT CGT TGG ACC CTG GAA GAT CAC GGT CCT CCA GTG CAT CAT GTC AAA CTT GGG CGC
D R W T L E D H G P P V H H V K L G R

TCA AAC ACG GTA TCA ATT GCT GAA TGC GCA AGA GGA TAC CGA CCC TGC AGG GGA CGG
S N T V S I A E C A R G Y R P C R G R

AGA CCA GCC AGA CGA CCA CCG ATC CGG AGA CAC CCC TCG TTC TGG GGT ACC CTC CGG
R P A R R P P I R R H P S F W G T L R

GGG CTG GTC TCA GAA GCT CAG CGA AGG CAA GAA GAT CGG ATG TCT GAT CTT GAG AAC
G L V S E A Q R R Q E D R M S D L E N

AGA ATG GCA GAA TTG GAG GAA CGA TTT GAG GAC CTT GCG CTG GTT GAC TCT GGG GGG
R M A E L E E R F E D L A L V D S G G

AAA AAT CCT GCA GCT CCC GCT CAG TCT GTT AGT CCT CCT AGT TCG AAT CCT TTT GCA
K N P A A P A Q S V S P P S S N P F A

TAT TCT CTC TCC CAC TTT TCA AAA TCA AAG AGG GTG GAC TGT GGG GAG AAA GGG AAC
Y S L S H F S K S K R V D C G E K G N

AGG TGG GGA CGA CCG GGA GCT TTC CCC GGA GCT GGA ATA TCT GGG TTG GAC TGG ATC
R W G R P G A F P G A G I S G L D W I

GAG TCA GGA GAT GGT GGA GAT GAG AGA CCT AAA GGA GGA AGA TAT CCC CGA GGA GGG
E S G D G G D E R P K G G R Y P R G G

AAT ACG CCC AGT TGA
N T P S *
```

Annexe E- Liste des amorces ayant servi à générer les diverses constructions plasmidiques utilisées dans l'article du chapitre 2.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (mutation en gras)	Site de restriction
NESWTF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAATTGGAGGAACGATTTGAGGACCTTGCG CTGGTTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESWTR	5'-TGACCGGTGCAACCAGCGCAAGGTCCTCAAATCGTTCCTCCAAT TCTGCCATTGGATCCCG-3'	AgeI
NESM116AF	5'-CGGGATCCAG CAG CAGAATTGGAGGAACGATTTGAGGACCTTG CGCTGGTTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESM116AR	5'-TGACCGGTGCAACCAGCGCAAGGTCCTCAAATCGTTCCTCCAAT TCTGCT GCT GGATCCCG-3'	AgeI
NESL119AF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAAG CAG AGGAACGATTTGAGGACCTTG CGCTGGTTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESL119AR	5'-TGACCGGTGCAACCAGCGCAAGGTCCTCAAATCGTTCCTCT GCT TCTGCCATTGGATCCCG-3'	AgeI
NESF123AF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAATTGGAGGAACGAG CAG AGGACCTTG CGCTGGTTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESF123AR	5'-TGACCGGTGCAACCAGCGCAAGGTCCTCT GCT CGTTCCTCCAAT TCTGCTGCTGGATCCCG-3'	AgeI
NESL126AF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAATTGGAGGAACGATTTGAGGAC GCAG CGCTGGTTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESL126AR	5'-TGACCGGTGCAACCAGCGCT GCG TCCTCAAATCGTTCCTCCAAT TCTGCCATTGGATCCCG-3'	AgeI
NESL128AF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAATTGGAGGAACGATTTGAGGACCTTGCG GCAG TTGCACCGGTCA-3'	BamHI
NESL128AR	5'-TGACCGGTGCAACT TGCC CAAGGTCCTCAAATCGTTCCTCCAAT TCTGCCATTGGATCCCG-3'	AgeI
NESV129AF	5'-CGGGATCCAATGGCAGAATTGGAGGAACGATTTGAGGACCTTGCG CT GGCAG CACCGGTCA-3'	BamHI
NESV129AR	5'-TGACCGGTGCT TGCC CAGCGCAAGGTCCTCAAATCGTTCCTCCAAT TCTGCCATTGGATCCCG-3'	AgeI
NESKOF	5'-CGGGATCCAG CAG CAGAAG CAG AGGAACGAG CAG AGGAC GCAG	BamHI

	GCGGCAGCAGCACCGGTCA-3'	
NESKOR	5'-TGACCGGTGCT GCTGCCGCTGCGTCCTCTGCTCGTTCCTCTGCT TCTGCTGCTGGATCCCCG-3'	AgeI
JDVRev5	5'-TCCGAATTCTATGATGGAAGAAGG-3'	EcoRI
JDVRev3	5'-GCAAGGGCCCACTGGGCG-TATTCC-3'	ApaI
JM1F	5'-TCCGAATTCTATGACTGCGCGTGAGGCA-3'	EcoRI
JM2F	5'-PHOS-GTCAAACCTGGGCGCTCAAAC-3'	
JM2R	5'-PHOS-TAGGTGCCCTTTGTCCACAGC-3'	
JM3F	5'-PHOS-TGCAGGGGACGGAGACCAGCC-3'	
JM3R	5'-PHOS-ATGATGCACTGGAGGACC-3'	
JM4F	5'-PHOS-ACCCTCCGGGGGCTGGTC-3'	
JM4R	5'-PHOS-GGGTCGGTATCCTCTTGCGCA-3'	
JM5F	5'-PHOS-GAGAACAGAATGGCAGAATTG-3'	
JM5R	5'-PHOS-ACCCAGAACGAGGGGTGTCT-3'	
JM6F	5'-PHOS-GGGAAAAATCCTGCAGCTCCC-3'	
JM6R	5'-PHOS-AAGATCAGACATCCGATCTTC-3'	
JM7F	5'-PHOS-TATTCTCTCTCCCACTTTTCAAATCA-3'	
JM7R	5'-PHOS-CCCAGAGTCAACCAGCGCAAG-3'	
JM8F	5'-PHOS-TGGGGACGACCGGGAGCTTTC-3'	
JM8R	5'-PHOS-TGCAAAAGGATTCGAACTAGG-3'	
JM9F	5'-PHOS-GGAGATGGTGGAGATGAGAGA-3'	
JM9R	5'-PHOS-CCTGTTCCCTTTCTCCCCACA-3'	
JM10R	5'-GCAAGGGCCCTCATGACTCGATCCAGTCCAA-3'	ApaI
MutNLS1F	5'-GATACCGACCCTGCG C AGGACGGAGACCAG-3'	
MutNLS1R	5'-CTGGTCTCCGTCCT G CGCAGGGTTCGGTATC-3'	
MutNLS2F	5'-CGACCCTGCAGGGGAG C AAGACCAGCCAGACG-3'	
MutNLS2R	5'-CGTCTGGCTGGTCT T GCTCCCCTGCAGGGTTCG-3'	
MutNLS3F	5'-CTGCAGGGGACGG G CACCAGCCAGACGAC-3'	
MutNLS3R	5'-GTCGTCTGGCTGGT G CCCCGTCCTGCAG-3'	
MutNLS4F	5'-GACGGAGACCAGCC G CACGACCACCGATC-3'	
MutNLS4R	5'-GATCGGTGGT C GTGCGGCTGGTCTCCGTC-3'	
MutNLS5F	5'-GAGACCAGCCAGAG C ACCACCGATCCGG-3'	
MutNLS5R	5'-CCGGATCGGTGG T GCTCTGGCTGGTCTC-3'	
MutNLS6F	5'-CAGACGACCACCGAT C GCAAGACACCCTCGTTC-3'	
MutNLS6R	5'-GAACGAGGGGTGTCT T GCGATCGGTGGTTCGTCTG-3'	

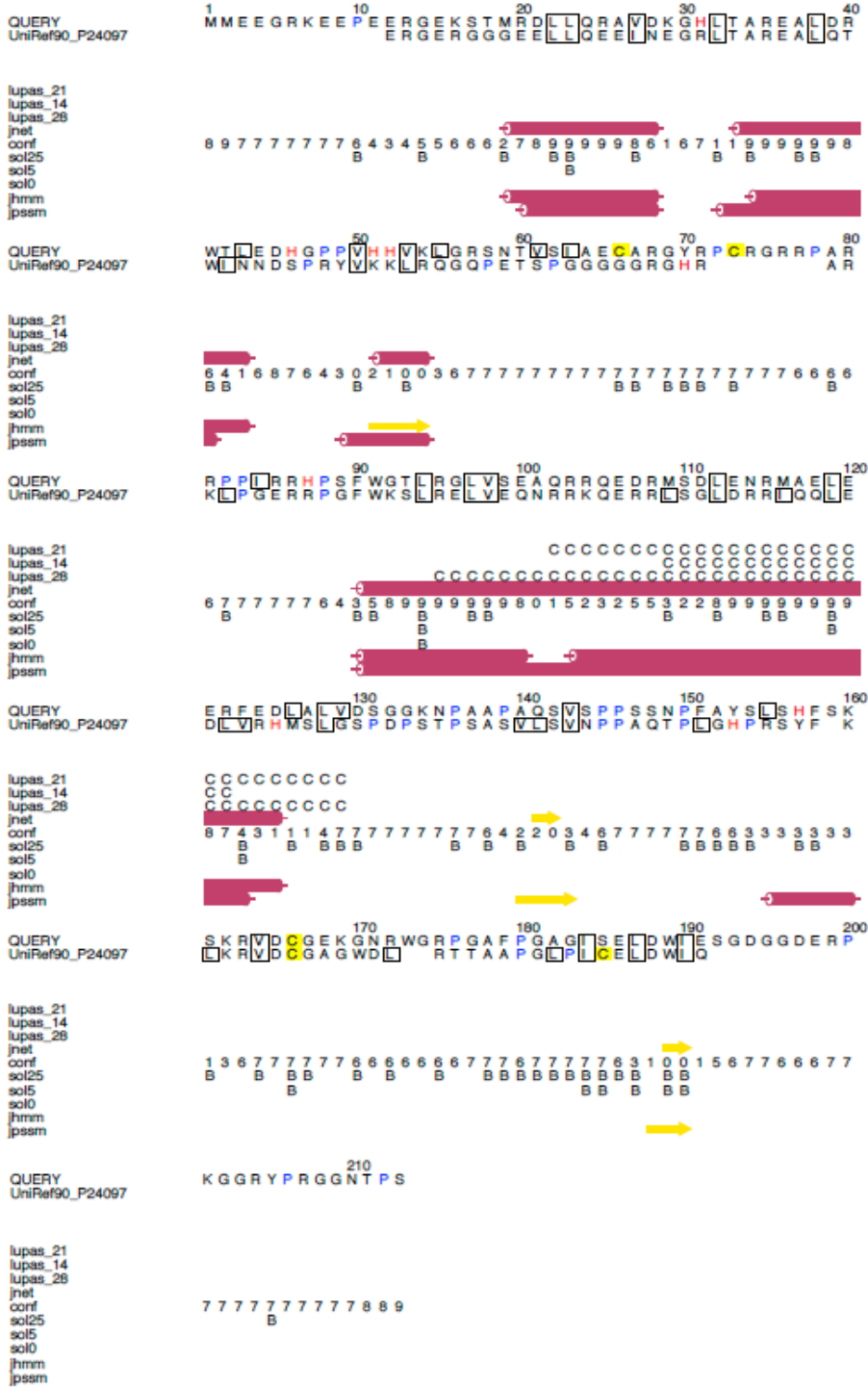
MutNLS7F	5'-GACCACCGATCCGGG CAC ACCCCTCGTTC-3'	
MutNLS7R	5'-GAACGAGGGGTGT G CCCGGATCGGTGGTC-3'	
MutNLS8F	5'-CCCTGCAGGGGAG CAGC ACCAGCCAGACGACCA-3'	
MutNLS8R	5'-TCGTCTGGCTGGT GCTG CTCCCCTGCAGGGTCG-3'	
MutNLS9F	5'-CGGAGACCAGCC GCAGC ACCACCGATCCGGAGA-3'	
MutNLS9R	5'-CCGGATCGGTGGT GCTG CGGCTGGTCTCCGTCC-3'	
MutNLS10F	5'-CGACCACCGAT GCAGC ACCCCTCGTTCTGG-3'	
MutNLS10R	5'-GAACGAGGGGTGT GCTG CGATCGGTGGTCGTCT-3'	
MutNLS11F	5'-CGACCCTGC GCAGGAGCAGC ACCAGCCAGA-3'	
MutNLS11R	5'- TGCTG CTCCT GCGC AGGGTCCGGTATCC-3'	
MutNLS12F	5'-CCAGCC GCAGC ACCACCGAT GCAGCA -3'	
MutNLS12R	5'-GATCGGTGGT GCTG CGGCTGGT GCTG CTCC-3'	
MutNLS13F	5'- GCAGC ACCAGCC GCAGC ACCACCGATCCGGAGA-3'	
MutNLS13R	5'-GATCGGTGGT GCTG CGGCTGGT GCTG CTCC-3'	
MutNLS14F	5'-CGACCCT GCG CGGGAGCA-3'	
MutNLS14R	5'-TGCTGCTCCC GCGC AGGG-3'	
MutNLS15F	5'-GTCTCAGAAGCT GCGGCAGCGGC AGAAGATCGGATGTCT-3'	
MutNLS15R	5'-AGACATCCGATCTTCT GCCGCTGCCG CAGCTTCTGA-3'	
MutNLS15AR	5'-ATCTTCT GCCGCTGCCG CAGCTTCTGAGACCAGCCCCG-3'	
MutNLS15BF	5'-GAAGCT GCGGCAGCGGC AGAAGATCGGATGTCTGAT-3'	
MutNLS16F	5'- GCGGCAGCGGC AGAAGATCGGATG-3'	
MutNLS16R	5'- TGCCGCTGCCG CAGCTTCTGAGAC-3'	
MutNLS17F	5'-TGGGGTACCCT GCAGGG GCTGGTCTCAGAA-3'	
MutNLS17R	5'-TGAGACCAGCCCT GCGAG	
JDVNLS monoF	5'-AACTCGAGAAAGGGGACGGAGA-3'	XhoI
JDVNLS monoR	5'-AAGAATTCTCTCCGGATCGGTGG-3'	EcoRI
JDVNLSbiR	5'-GAATTCTTGCCTTCGCTGAGC-3'	EcoRI
QRRQF	5'-PHOS-TCGAGTTCAGCCAAGGCAAG-3'	XhoI
QRRQR	5'-PHOS-AATTCTTGCCTTCGCTGAAC-3'	EcoRI
pEGFPF	5' TGGTGTCAAAAATCCGGACTCAGATCTCGAG	
pEGFPR	5' TTGTA AACGACCTTGACAGCTCGTCCATGCC	
BgalF	5'GAGCTGTACAAGGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG	
BgalR	5' TCTGAGTCCGATTTTTGACACCAGACCAACTGGTA	

Annexe F- Liste des amorces ayant servi à générer les diverses constructions plasmidiques utilisées dans l'article du chapitre 3.

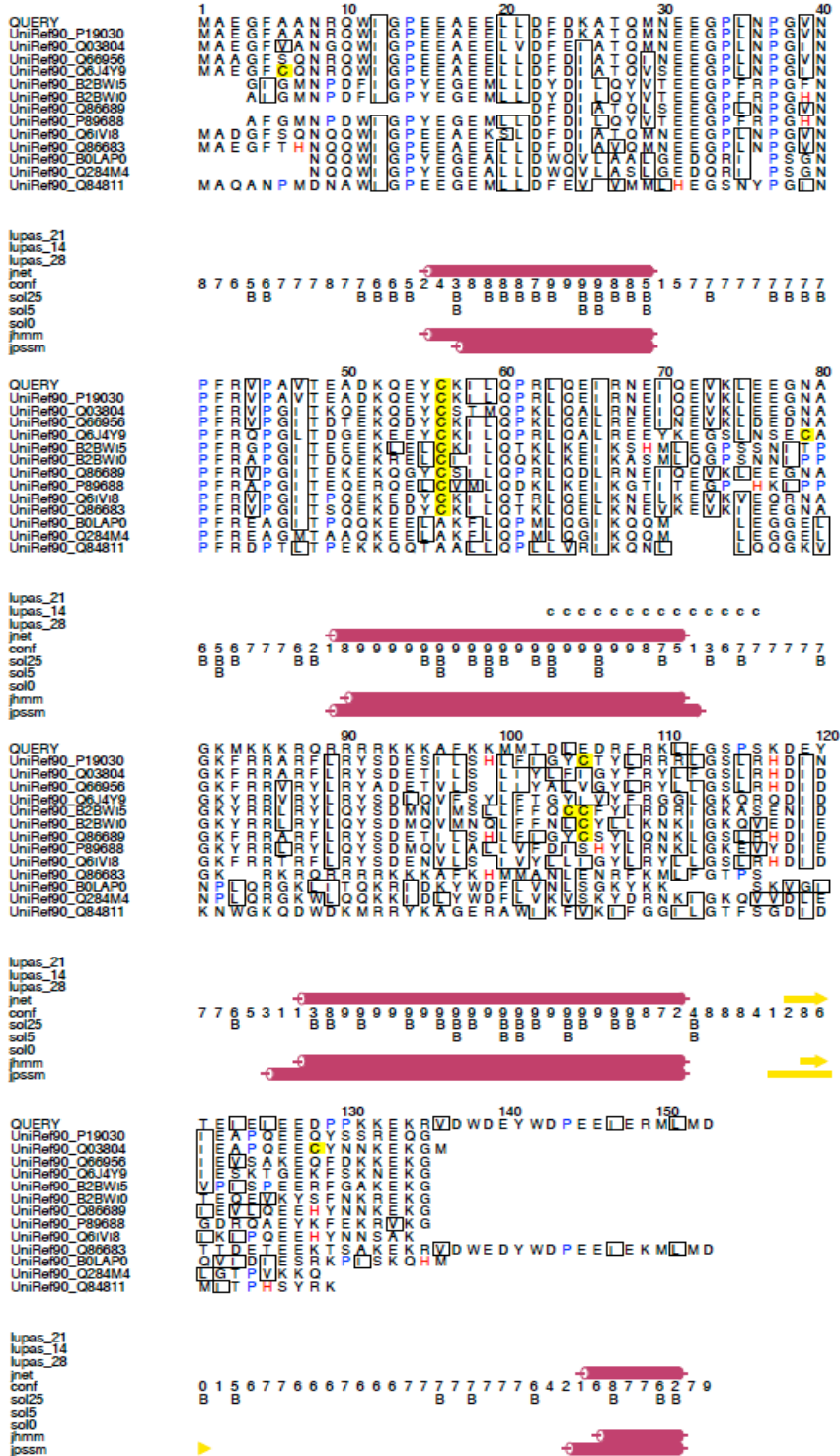
Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Site de restriction
FIVRev5	5'-AACTCGAGTTATGGCAGAAGGGTTTG-3'	XhoI
FIVRev3	5'-AAGAATTCGTCCATAAGCATTTCTTTCTATTTCTTC-3'	EcoRI
FM1F	5'-AACTCGAGTTATGTTAGATTTTGATAAAGCAACACAA -3'	XhoI
FM2F	5'-PHOS-CCATTTAGAGTACCTGCAGTAACAGAA -3'	
FM2R	5'-PHOS-TAGCTCTTCAGCTTCTTCTGGCCCTAT-3'	
FM3F	5'-PHOS-CCCCGATTACAAGAGATAAGGAATGAA-3'	
FM3R	5'-PHOS-GTTTACTCCTGGATTTAGTGGCCC-3'	
FM4F	5'-PHOS-GGTA AAAATGAAAAAGAAAAGACAAAGAAGAAGA-3'	
FM4R	5'-PHOS-TTGTAATATCTTACAATATCTTGCTTGTCTGC-3'	
FM5F	5'-PHOS-ATGACAGATTTAGAAGACCGCTTCAGA-3'	
FM5R	5'-PHOS-TGCATTTCTTCTTCTAGTTTTACTTCTTG-3'	
FM6F	5'-PHOS-ACAGAAATTGAGATAGAAGAAGACCCT-3'	
FM6R	5'-PHOS-CATTTTCTTAAAGGCCTTCTTCTTCTTCT-3'	
FM7F	5'-PHOS-TATTGGGACCCTGAAGAAATAGAAAGA-3'	
FM7R	5'-PHOS-GTATTCATCTTTAGAGGGTGAGCC-3'	
FM8R	5'- AAGAATTCCTCATCCCAGTCCACCCT-3'	EcoRI
NLSFIVF	5'-AACTCGAGTTAAAAAGAAAAGACAAAGAAGA-3'	XhoI
NLSFIVR	5'-AAGAATTCCTTTCTTAAAGGCCTTCTTCTTCT-3'	EcoRI
MutNLS1F	5'-GCAGGTA AAAATGCAAAGAAGAAGAAGAAGAAG	
MutNLS1R	5'-TCTTCTTCTTTGCATTTTACCTGCATTTCCCTTC-3'	
MutNLS2F	5'-AAGAAAAGACAAAAGAAGAAGGCCTTTAAGAAAATG-3'	
MutNLS2R	5'-GGCCTTCTTCTTTTGTCTTTTCTTTTTCATTTTACCTGC-3'	
MutNLS3F	5'-TCTTCTTCTTCTGCCTTTAAGAAAATGATGACAGAT-3'	
MutNLS3R	5'-TTTCTTAAAGGCTCTTCTTCTTCTTTGTCTTTTCTT-3'	
MutNLS4F	5'-AAGAAGGCCTTTATGATGACAGATTTAGAA-3'	
MutNLS4R	5'-TCTGTCATCATAAAGGCCTTCTTCTTTCTTCT-3'	
MutNLS5F	5'-GGAAATGCAGGTGCAATGAAAAAGAAAAGAC-3'	
MutNLS5R	5'-GTCTTTTCTTTTTCATTGCACCTGCATTTCC-3'	
MutNLS6F	5'-GCAGGTA AAAATGGCCTTTAAGAAAATGATGACAGAT-3'	

MutNLS6R	5'-TTTCTTAAAGGCCATTTTACCTGCATTTTCCTTC-3'	
NLSΔ1F	5'-PHOS-TCGAGTTAAAATGAGAAGAAGAAGAAGAAGGCC TTTAAGAAAG-3'	XhoI
NLSΔ1R	5'-PHOS-AATTCTTTCTTAAAGGCCTTCTTCTTTCTTCTTCTTCATT TAAC-3'	EcoRI
NLSΔ2F	5'-PHOS-TCGAGTTAAAATGAAAAAGAAAAGACAAAAGAAGAAGG CCTTTAAGAAAG-3'	XhoI
NLSΔ2R	5'-PHOS-AATTCTTTCTTAAAGGCCTTCTTCTTTCTTTTTCATT TTAAC-3'	EcoRI
NLSΔ3F	5'-PHOS-TCGAGTTAAAATGAAAAAGAAAAGACAAAGAAGAAGAA GAGCCTTTAAGAAAG-3'	XhoI
NLSΔ3R	5'-PHOS-AATTCTTTCTTAAAGGCTCTTCTTCTTTGTCTTTTCTT TTTCATTTAAC-3'	EcoRI
NLSΔ4F	5'-PHOS-TCGAGTTAAAATGAAAAAGAAAAGACAAAGAAGAAGAA GAAAGAAGAAGGCCTTTG-3'	XhoI
NLSΔ4R	5'-PHOS-AATTCAAAGGCCTTCTTCTTCTTCTTCTTTGTCTTTCT TTTTCATTTAAC-3'	EcoRI
FIVNLSF	5'-PHOS-TCGAGTTAAAATGAAAAAGAAAAGACAAAGAAGAAGAA GAAAGAAGAAGGCCTTTAAGAAAG-3'	XhoI
FIVNLSR	5'-PHOS-AATTCTTTCTTAAAGGCCTTCTTCTTCTTCTTCTTTG TCTTTCTTTTTCAGCATAAC-3'	EcoRI
pEGFPF	5' TGGTGTCAAAAATCCGGACTCAGATCTCGAG	
pEGFPR	5' TTGTA AACGACCTTG TACAGCTCGTCCATGCC	
bgalF	5'GAGCTGTACAAGGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG	
bgalR	5' TCTGAGTCCGGATTTTTGACACCAGACCAACTGGTA	

Annexe G - Structures tertiaires prédites dans la protéine Rev du JDV



Annexe H- Structures tertiaires prédites dans la protéine Rev du VIF



Annexe I – Contributions de l'étudiante durant le Doctorat

Publications

Passos-Castillho AM, Marchand C, Archambault D. 2018. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication. *Virology*, 515 ;158- 164.

Marchand C, Lemay G, Archambault D. 2019. The Jembrana disease virus Rev protein: identification of novel lentiviral nuclear/nucleolar localization and nuclear export signals. *PLOS ONE*, 14(8): e0221505.

Résumés de congrès

Marchand, C., D. Archambault et G. Lemay. 2016. Caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine Rev de lentivirus. Colloque annuel BioMed, Centre de congrès Palace, Laval, 5 mai (affiche).

Marchand, C., G. Lemay and D. Archambault. 2017. Shuttling signals of the Jembrana disease virus Rev protein. Colloque annuel BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, 28 avril (présentation orale).

Marchand, C., G. Lemay and D. Archambault. 2017. Identification of the nuclear/nucleolar import and nuclear export signals of the Jembrana disease virus Rev protein. RetroPath Prague (affiche).

Supervision de stagiaires/étudiants

Été 2015 – Supervision d'un étudiant en stage d'été pour le cours BIA4100

Été 2016 – Supervision d'une étudiante en stage d'été pour le cours BIA4100

Été 2017 – Supervision d'une étudiante en stage d'été pour le cours BIA4100

2017-2018 – Supervision d'une étudiante à la maîtrise

Enseignement

2014-2018 - Auxiliaire d'enseignement à l'UQAM pour les cours de microbiologie et d'immunologie dans le programme de Biologie et de Biochimie (BIA1400, BIA2500, BIO5123, BIO3530).

2017-2018 - Chargée de cours à l'UQAM (BIA1400- Microbiologie (3CR), BIA2500- Immunologie (4CR)).