



HAL
open science

Caractérisation des fonctions cellulaires du facteur de restriction viral APOBEC3A

Mathilde Niocel

► **To cite this version:**

Mathilde Niocel. Caractérisation des fonctions cellulaires du facteur de restriction viral APOBEC3A. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEN017 . tel-01831525v2

HAL Id: tel-01831525

<https://theses.hal.science/tel-01831525v2>

Submitted on 4 Sep 2018

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

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



Numéro National de Thèse : 2017LYSEN017

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N°340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité : Virologie

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 05/07/2017, par :

Mathilde NIOCEL

Caractérisation des fonctions cellulaires du facteur de restriction viral APOBEC3A

Devant le jury composé de :

Dr Florence MARGOTTIN-GOGUET	Directrice de Recherche Institut Cochin	Rapporteuse
Pr Stéphane PAUL	Professeur des universités-PH CHU St Etienne	Rapporteur
Dr Evelyne MANET	Directrice de Recherche - ENS de Lyon	Présidente du jury
Dr Andrea CIMARELLI	Directeur de Recherche - ENS de Lyon	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Abréviations	6
1 Introduction	9
I. Le VIH, virus responsable du SIDA	9
A. Découverte du virus et épidémiologie	9
B. Pathogénèse associée au VIH	11
C. Histoire évolutive du VIH	19
D. Structure et génome du VIH	22
II. L'hôte : de la cellule cible à la réponse immunitaire innée	26
A. La cellule, lieu de la réplication virale	26
B. Réponse immunitaire innée et interféron	45
C. Gènes de réponse à l'interféron et facteurs de restriction	53
III. Les APOBEC3, cytidines désaminases à multiples rôles	64
A. La famille des APOBEC3	65
B. Rôle antiviral des APOBEC3	71
C. Implication des cytidines désaminases dans les cancers	80
D. Hypothèses de travail	87
2 Outils expérimentaux	90
A. Purification de cellules primaires du sang	90
B. Lignées cellulaires	91
C. Plasmides utilisés	91
D. Établissement de lignées cellulaires inductibles stables	91
E. Mesure de la prolifération cellulaire	94
F. Marquage de dommages à l'ADN	94
G. Immunofluorescence	94

H.	Détection de ROS	95
I.	Purification d'A3A à partir de cellules HeLa	96
3	Résultats	100
A.	Établissement de lignées stables exprimant APOBEC3A de façon inductible par la doxycycline	100
B.	Purification d'APOBEC3A à partir de cellules humaines	101
C.	APOBEC3A conduit à l'arrêt du cycle cellulaire	103
D.	APOBEC3A induit des dommages à l'ADN dans les cellules en division	103
E.	La localisation cellulaire d'APOBEC3A est modulée selon l'état de différenciation de la cellule	106
F.	Les dommages à l'ADN générés par A3A conduisent à la production de ROS et à la mort de la cellule	111
G.	Les isoformes courte et longue d'A3A semblent avoir le même comportement	113
4	Discussion	118
5	Conclusion et perspectives	126
6	Annexe	132
	Bibliographie	144

Remerciements

Je souhaite remercier le Dr Florence Margottin-Goguet et le Pr Stéphane Paul d'avoir accepté d'être rapporteurs pour cette thèse. Leurs commentaires pertinents et leur regard extérieur ont apporté un éclairage nouveau à ce travail de thèse et je les en remercie. Je remercie également le Dr Évelyne Manet d'avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Andrea Cimorelli, qui a encadré mon travail depuis le stage de M2 et durant ces trois années de thèse. Merci d'avoir laissé une chance à une chimiste et de m'avoir permis de faire une thèse de virologie qui est devenue de la biologie cellulaire. Merci pour tes nombreuses idées et pour toutes les pistes que nous avons explorées. Les cinétiques ne sont peut-être pas les manipulations les plus drôles, mais elles sont tellement instructives. Merci pour tes précieux conseils concernant le travail de recherche et tes nombreux retours sur les présentations orales. Merci enfin de m'avoir permis d'apprendre à organiser mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le Pr Christophe Terzian, le Dr Frédérick Arnaud et le Dr Marc Lavigne pour leurs conseils avisés qui ont guidé ce travail de thèse. Je remercie particulièrement Marc Lavigne pour toutes ses recommandations sur la thèse et le monde de la recherche en général.

Merci à tous les membres de l'équipe "Interaction Hôte-Pathogène lors de l'infection lentivirale".

Merci Rominou avec qui j'aurais traversé cette thèse d'un bout à l'autre ! Merci pour ton aide pour les manipulations d'IF et toutes les autres ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, d'abord être docteur (puis peut-être professeur) et heureux dans ta petite famille. Merci Véro de m'avoir formée quand je suis arrivée et tout au long de cette thèse, d'être toujours prête à me rendre service quand j'en ai besoin et pour nos discussions diverses et variées (vive la RT !). Merci Xuan-Nhi pour tous les conseils pour gagner du temps, merci pour toutes les techniques que tu m'as montrées, pour ta bonne humeur et pour ta délicieuse cuisine. Je n'imaginai pas ma thèse sans toi, alors merci d'avoir eu le concours et de nous supporter encore de longues années ! Merci Meg Sisi pour les relectures attentives, les discussions scientifiques ou non, les pauses cigarette et la petite touche hipster du labo. Merci Lucie d'avoir apporté une nouvelle branche à notre équipe et ton éclairage à toutes nos discussions scientifiques. Merci à Thomas, Stéphanie, Fabien, Léa, Anuj de contribuer à la bonne ambiance qui règne dans le labo. Merci aux membres passés de l'équipe : Fanny, Kévin, Claire, Éloïse, Nannan, Nina, Stefania et à tous les stagiaires. Merci à tous pour votre aide pour les manipulations, que ce soit pour passer les cellules pendant les vacances ou quand il s'agit de réfléchir à plusieurs sur les problèmes scientifiques.

Je remercie également les membres des équipes OR et EBV avec lesquels nous cohabitons avec plaisir. Merci Aurélien pour toutes nos discussions pédagogie-administratif-science et autres. Merci

également pour ton aide au microscope. Merci Chloé, Sandrine et Hélène pour vos conseils scientifiques et l'aide que vous avez pu m'apporter. Merci Nico le compagnon de mes soirées en pièce culture, merci Gerges mon libanais préféré, merci Louise qui a connu nos 2 équipes de l'intérieur, merci Fabrice pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Je remercie également les membres des équipes TEV, EVIR et VIV et toutes les personnes du CIRI que j'ai côtoyé au cours de ces 3 ans. Merci aux membres du PSF à l'IBCP pour leur aide précieuse sur le projet purification. Merci Sandrine Mouradian pour l'aide au cytomètre.

Merci aux chimistes, ma 2ème famille à l'ENS. Nous avons traversé pas mal de choses ensemble, et maintenant nous voilà presque tous docteurs (et agrégés). Merci Maëlle et Romain pour tous les moments passés ensemble à l'ENS et pour les pauses déjeuner. Merci Piepie, Elo, Benji et Apo, les "douaiens". Merci d'être passés prendre un café/potins quand vous étiez à l'ENS. Merci Estelle pour nos années en tant que binôme de TP (pas douées mais une super équipe). Merci Antoine de réapparaître de temps en temps dans nos vies, c'est toujours très sympa ! Je garderai de très bons souvenirs de nos sept (7!!) ans passés ensemble à Lyon (et pas que), et j'espère que vos postdocs seront l'occasion d'en construire plein d'autres.

Merci à mes amis de l'ENS sans qui ces années auraient été beaucoup moins drôles. Merci Aude, Margaux, Mathilde, Nathalie et Nina pour nos soirées filles. Merci Mathilde pour ton petit programme qui m'a fait gagner un temps précieux ! Merci Alice et Lucie pour tous vos précieux conseils et toutes nos discussions. Merci Alix et Maud pour nos mercredi midi sushi et merci à tou.te.s les filles et garçons d'Incidences pour m'avoir permis de présenter à vos côtés deux spectacles dont je suis très fière. Merci Adrien, Laure, Mathieu et Corentin pour la colocation, le canapé à Paris ou à Nantes et nos grandes discussions plus ou moins philosophiques.

Merci à mes amis de Limoges et de Toulouse de m'avoir soutenue dans ces moments difficiles même si nos vies sont maintenant très différentes. Merci Céline, Laëtitia et Marie de continuer à me supporter après toutes ces années. Merci Camille, Vincent et Benoît d'être toujours une petite bulle de bonheur quand on se retrouve. Merci Alex, mon plus vieil ami de l'ENS pour nos cafés, nos discussions, le naturalisme, l'agrégation et bien d'autres choses encore.

Merci à ma famille qui me soutient quels que soient les choix étranges que j'ai pu faire au cours de ma scolarité. Merci à mes parents et à mon frère d'être les personnes géniales que vous êtes.

Merci enfin Arthur, sans qui je n'aurais certainement pas survécu à cette 3ème année de thèse. Merci de me soutenir et de m'épauler au quotidien. J'ai hâte que nous partions ensemble vers de nouveaux horizons bretons.

Je souhaite dédier cette thèse à mes grand-mères Michèle et Monique, deux femmes formidables qui sont une grande source d'inspiration dans ma vie.

Résumé

APOBEC3A (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3 A) appartient à la famille des cytidines désaminases, qui clivent les cytidines en uraciles. APOBEC3G (modèle de la famille) est un facteur de restriction du VIH : son incorporation dans la particule virale lui permet de désaminer le génome viral néoformé, entraînant hypermutations et dégradation de l'ADN viral.

A3A, au contraire, n'est pas incorporée dans la particule virale : la protéine, exprimée spécifiquement dans les cellules myéloïdes de façon inoffensive pour la cellule, agit de la même façon qu'A3G en s'attaquant au virus dès son entrée dans la cellule. Physiologiquement, dans les cellules non-myéloïdes, les APOBEC3 désaminent l'ADN cellulaire simple brin, dont les uraciles sont retirés par UNG2. Les sites abasiques sont clivés par la machinerie de réparation de l'ADN, conduisant parfois à des cassures double-brin et à la mort de la cellule.

L'objectif de la thèse était de comprendre cette différence de toxicité selon le type cellulaire. Pour cela, des lignées cellulaires inductibles pour A3A ont été créées en cellules HeLa et U937 (monocytaire). Les données obtenues indiquent qu'A3A, partiellement nucléaire, édite l'ADN des cellules en division, conduisant à des dommages à l'ADN, à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la mort des cellules. Les cellules différenciées ne présentent pas ce type de dommages, et cela s'explique par une localisation différente de la protéine. Ces résultats permettent de faire pour la première fois le lien entre dommages à l'ADN induits par un membre de la famille des A3 et production de ROS, et donc à l'induction d'une activation immunitaire. Cette activation pourrait avoir des implications lors de l'infection ainsi que dans les processus tumorigéniques.

Abréviations

AAV = Adeno-Associated Virus

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

ALIX = ALG-2 (apoptosis-linked gene 2)-interacting protein X

APOBEC = Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

ARN = Acide RiboNucléique

ATP = Adénosine TriPhosphate

BER = Base Excision Repair

BST-2 = Bone Marrow Stromal antigen 2 (= Téthérine)

CDA = Cytidine DeAminase domain

CDC = Center for Disease Control (USA)

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDR = DNA Damage Response

dNTP = désoxyNucléotides TriPhosphate

Dox = Doxycycline

ESCRT = Endosomal Sorting Complex Required for Transport

GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissue

GTP = Guanosine TriPhosphate

HEK 293 T = Human Embryonic Kidney 293 T

HTLV = Human T-Lymphotropic Virus

IFN = Interféron

IRES = Internal Ribosome Entry Site (Site interne d'entrée du ribosome)

ISG = Interferon Stimulated Genes

kDa = kiloDalton

LT CD4 = Lymphocytes T CD4

LTR = Long Terminal Repeat

MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinases

MDDC = Monocyte-Derived Dendritic Cells

MDM = Monocyte-Derived Macrophage

MLV = Murine Leukemia Virus (Virus de la leucémie murine)

NES = Nuclear Export Signal

NLS = Nuclear Localization Signal

NK = Natural Killer

NLR = Nod like receptor

NPC = Nuclear Pore Complex (Complexe de pore nucléaire)
PAMP = Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells
PIC = Pre-Integration Complex
PI(4,5)P₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PMA = Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PRR = Pattern Recognition receptor
RLR = RIG-I like receptor
ROS = Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
RRE = Rev Responsive Element
RT = Reverse Transcriptase (transcriptase inverse)
RTC = Reverse Transcription Complex
SDS = Sodium Dodécyl Sulfate
SIDA = Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SVF = Sérum de Veau Foetal
TLR = Toll-like receptor
TNF = Tumor Necrosis Factor
VHB = Virus de l'Hépatite B
VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPH = PapillomaVirus Humain
ZDD = Zinc-Dependant Deaminase

Chapitre 1

Introduction

I. Le VIH, virus responsable du SIDA

A. Découverte du virus et épidémiologie

Au début des années 1980, le centre de contrôle des maladies (CDC = Center for Disease Control) des Etats-Unis décrit des cas inhabituels de *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) chez des hommes jeunes ayant des rapports homosexuels avec de multiples partenaires [Gottlieb et al., 1981]. Cette infection touche habituellement des patients immunodéprimés (personnes âgées ou sous traitement immunosuppresseur) et il est donc inhabituel de l’observer chez des patients jeunes sans antécédents médicaux. Dans le même temps, une augmentation du nombre de syndromes de Kaposi est décrite chez d’autres patients présentant le même profil (hommes gays sans antécédents médicaux) [Center for Disease Control Task Force, 1982]. Ceci conduit le CDC à postuler l’existence d’une nouvelle forme d’immunodéficience humaine acquise, d’abord appelée GRID (Gay Related Immune Deficiency). Les premiers patients identifiés ayant tous une activité sexuelle fréquente avec de multiples partenaires, l’hypothèse de maladie sexuellement transmissible (MST) est formulée. Cela est renforcé par les antécédents d’autres MST des patients concernés (syphilis, gonorrhée). Des cas d’immunodéficience sont alors décrits chez des sujets hétérosexuels, des personnes transfusées et des usagers de drogues injectables [Harris et al., 1983] et il est postulé qu’il s’agit d’un agent infectieux transmissible. La maladie change alors de nom pour devenir le SIDA (AIDS pour Acquired ImmunoDeficiency Syndrome). En janvier 1983, l’équipe du professeur Luc Montagnier travaille sur une biopsie ganglionnaire d’un patient présentant des symptômes pré-SIDA [Barré-Sinoussi et al., 1983]. La mise en culture de cette biopsie permet la détection d’une forte activité de transcription inverse au bout de 15 jours, signe de la réplication active d’un rétrovirus. De plus, le bourgeonnement de particules virales depuis la surface de lymphocytes infectés est observé par microscopie électronique. Cette découverte est confirmée par l’équipe du professeur Gallo, qui isole le virus à partir de patients en phase SIDA ou pré-SIDA [Gallo

et al., 1984]. Ce virus est d'abord nommé HTLV-III par analogie avec 2 virus précédemment découverts, HTLV-I et HTLV-II. Le virus prendra son nom définitif de VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) en 1986. Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier reçoivent le Prix Nobel de Médecine en 2008 pour leur découverte du VIH.

Depuis la découverte du VIH en 1983, plus de 60 millions de personnes ont été infectées par ce virus et 25 millions en sont mortes (ONUSIDA). Depuis 2000, les nouvelles infections à VIH ont diminué de 35 % et les décès liés au SIDA ont baissé de 42 % après un pic atteint en 2004. Grâce à la prévention et aux opérations de sensibilisation des populations à l'échelle mondiale, 30 millions de nouvelles infections et 7,8 millions de décès ont été évités depuis 2000. En 2014, 36,9 millions de personnes vivaient avec le VIH et environ 2 millions de personnes ont été nouvellement infectées. Cependant, des disparités très fortes existent entre les pays, selon le niveau d'information et d'accès aux traitements des populations. Les pays les plus touchés sont les pays du sud de l'Afrique, avec plus de 25 % de la population adulte infectée au Swaziland (28,8%), 22% au Botswana et 19% en Afrique du Sud (cf figure 1.1). En France, environ 150000 personnes sont séropositives (0,2% de la population) à ce jour et 5925 personnes ont découvert leur séropositivité en 2015.

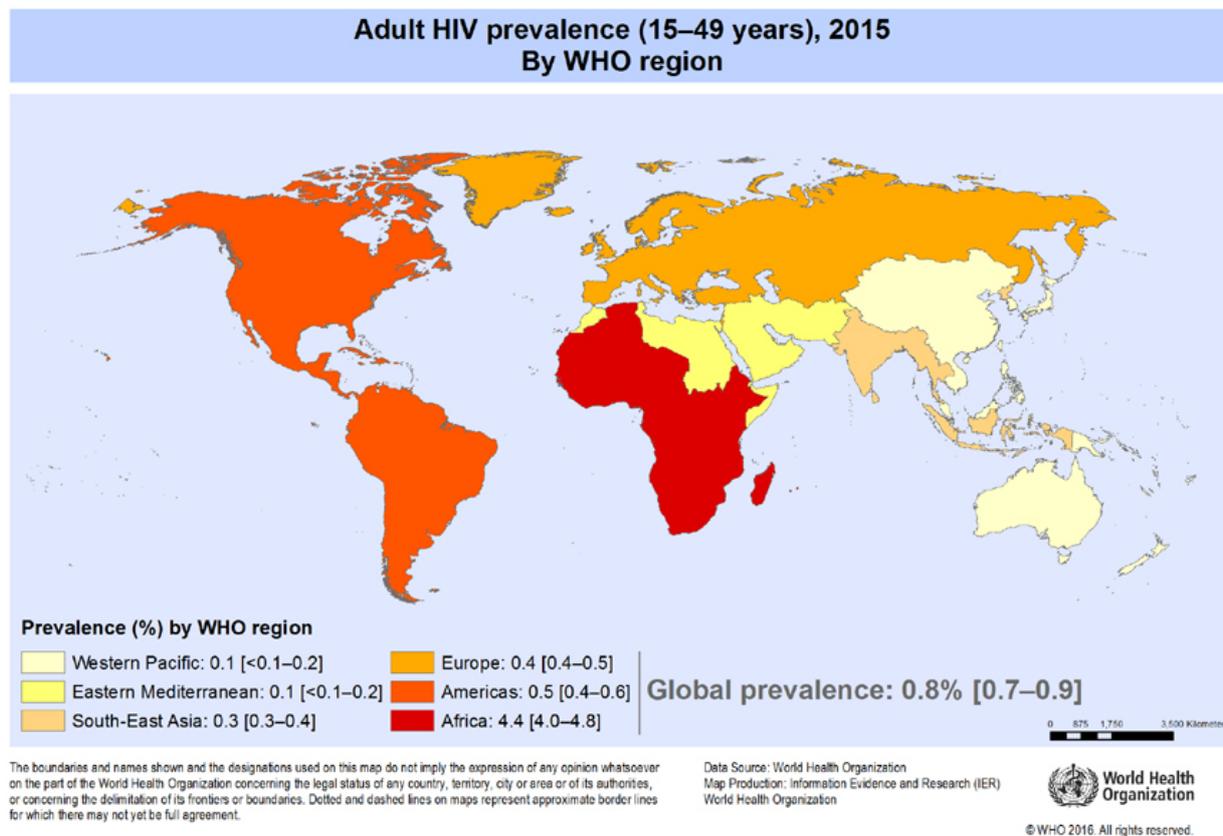


FIGURE 1.1 – Carte de prévalence mondiale du VIH en 2015 (source OMS)

B. Pathogénèse associée au VIH

B.1. Cellules cibles et tropisme

L'infection par le VIH affecte l'immunité de l'hôte, il paraît donc logique que le virus cible des cellules immunitaires. Les lymphocytes T CD4 sont les premières cellules dont l'infection a été caractérisée [Barré-Sinoussi et al., 1983]. Le virus est également capable d'infecter des cellules de la lignée myéloïde, à savoir monocytes, macrophages [Gartner et al., 1986a] et cellules dendritiques [Biberfeld et al., 1985]. Le tropisme du virus est régi par ses protéines d'enveloppe et leur interaction avec différents récepteurs portés par les cellules cibles. Le virus nécessite d'abord la présence du récepteur CD4 mais il n'est pas suffisant lorsqu'il est seul [Clapham and McKnight, 2002], [Maddon et al., 1986]. Le premier corécepteur décrit est le CXCR4, d'abord dénommé "fusin" car il permettait la fusion des membranes du virus avec la cellule-cible [Feng et al., 1996]. Le second, CCR5 a été découvert en 1996 par cinq équipes différentes [Alkhatib et al., 1996], [Choe et al., 1996], [Deng et al., 1996], [Doranz et al., 1996], [Dragic et al., 1996]. Les co-récepteurs impliqués, CXCR4 et CCR5 définissent si le virus est T-tropique (cellule T tropique) ou M-tropique (macrophage-tropique). Les souches virales T-tropiques utilisent le corécepteur CXCR4 et infectent principalement les lymphocytes T CD4 tandis que les souches M-tropiques utilisent le corécepteur CCR5 et infectent les lymphocytes T mémoire et les cellules de lignée myéloïde [Clapham and McKnight, 2002], [Gartner et al., 1986b].

Bien que le récepteur CD4 soit celui avec lequel le virus interagit préférentiellement, certaines cellules exprimant de faibles niveaux de CD4 sont infectées par le virus *in vivo* : les macrophages et les cellules dendritiques. Dans le cas des macrophages, il est probable que le virus s'attache à la cellule sans utiliser le CD4, notamment via une interaction entre les sucres des glycoprotéines d'enveloppe et d'autres sucres portés par les récepteurs cellulaires (par exemple le mannose macrophage receptor ou récepteur à mannose des macrophages [Larkin et al., 1989]). Pour les cellules dendritiques, une interaction entre DC-SIGN et l'enveloppe du virus a été mise en évidence, mais ne permet pas à elle seule d'expliquer l'infection de ces cellules [Geijtenbeek et al., 2000].

La connaissance du tropisme du VIH permet de mieux comprendre comment l'infection se met en place et progresse, et facilite le développement de stratégies ciblées pour réduire la progression de la maladie.

B.2. Phases de l'infection

a) Transmission du virus

La transmission du virus se fait par contact direct avec du sang, du sperme, du liquide séminal, du fluide vaginal et rectal et par le lait maternel [Hladik and McElrath, 2008]. La contamination d'une personne infectée vers une personne saine peut donc avoir lieu par voie sanguine, sexuelle, ou de la

mère à l'enfant. Afin de réduire le nombre de personnes nouvellement infectées, les objectifs 90-90-90 ont été mis en place par le programme des Nations Unies sur le VIH/SIDA. L'objectif est d'atteindre 90% de diagnostic chez les personnes infectées, que 90% des personnes infectées reçoivent un traitement antirétroviral et que la charge virale soit supprimée chez 90% de ces personnes d'ici 2020. Le fait d'être sous thérapie antirétrovirale diminue la charge virale plasmatique de l'individu infecté et contribue à réduire le risque de transmission. Parmi les efforts déployés pour éviter les nouvelles contaminations, la prévention cible plusieurs populations à risque élevé : les enfants de mère portant le virus, les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes, les travailleurs du sexe et les consommateurs de drogue en intraveineuse (pour revue : [Deeks et al., 2015]). Ainsi, des antirétroviraux sont proposés aux femmes enceintes pour éviter la contamination pendant la grossesse, un accouchement par césarienne limite les risques au moment de la naissance et du lait maternisé évite la transmission par l'allaitement. Des traitements antiviraux préventifs (prophylaxie pré-exposition) ou juste après une situation à risque (prophylaxie post-exposition) permettent également de limiter la transmission et la prolifération du virus chez les patients néo-infectés.

Les différents modes de transmission ne sont pas tous aussi efficaces et dépendent du premier tissu avec lequel le virus est en contact (voir table 1.1).

Voie d'exposition au virus	Site d'invasion par le virus	Infections pour 10 000 contacts
Transfusion sanguine	Sang	9 250
Drogue injectable avec matériel partagé	Sang	63
Sexe anal réceptif	Rectum (épithélium simple non kératinisé)	138
Sexe anal insertif	Tractus génital masculin (épithélium peu kératinisé à stratifié)	11
Sexe vaginal réceptif	Tractus génital féminin (épithélium squameux non kératinisé)	8
Sexe vaginal insertif	Tractus génital masculin (épithélium peu kératinisé à stratifié)	4
Sang maternel et sécrétion génitales lors de la naissance	Tractus intestinal	2260
Lait maternel	Tractus intestinal	3500

TABLE 1.1 – Transmission du VIH. Adapté de [Deeks et al., 2015] et [Hladik and McElrath, 2008]

Lorsque le virus est directement injecté dans le sang (transfusion ou utilisation d'aiguilles contaminées), il a de nombreuses occasions d'entrer au contact des cellules cibles. On observe d'ailleurs une très grande probabilité d'infection pour ce mode de transmission. Dans les autres cas, le virus doit d'abord traverser une barrière physique, l'épithélium. Il est d'abord capturé par le mucus ce qui lui assure un temps de contact prolongé avec l'épithélium. Il franchit ensuite la barrière épithéliale de plusieurs façons possibles, mais quel que soit le mode de pénétration de l'épithélium, cette traversée se produit en 30 à 60 minutes après l'exposition *in vivo* [Hladik and McElrath, 2008]. Une fois à l'intérieur du tissu riche en cellules T CD4⁺ mémoire, en cellules de Langerhans et en cellules dendritiques stromales, le virus peut facilement infecter sa première cellule cible (cf figure 1.3). Une hypothèse est que le virus profite de microlésions pré-existant dans ce tissu pour le traverser et accéder aux lymphocytes T et cellules dendritiques du stroma sous-jacent. Une autre hypothèse est qu'il traverse l'épithélium par transcytose en établissant des contacts directs avec les dendrites des cellules dendritiques (DC) intraépithéliales. Ces cellules de Langerhans sont capables d'endocyter le virus, sans être infectées [McMichael et al., 2010]. Bien qu'il n'y ait pas d'infection, la détection (ou *sensing*) du virus par les cellules de l'immunité commence dès cette étape. En effet, les cellules dendritiques possèdent de nombreux senseurs de l'infection, les PRR (Pattern Recognition Receptor) qui vont reconnaître des motifs appartenant aux virus ou autres pathogènes (acides nucléiques, protéines ...) [Towers and Noursadeghi, 2014]. Une fois ces PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) détectés, les cellules vont être capables d'initier une réponse immunitaire innée et adaptative (cf partie II.). Afin d'initier la réponse immunitaire, les cellules dendritiques de l'épithélium vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour y présenter les antigènes aux lymphocytes. Malheureusement, le virus va profiter de ce contact entre cellules pour trans-infecter des lymphocytes et démarrer une réplication active.

Les macrophages épithéliaux peuvent également être infectés, bien que moins efficacement que les lymphocytes, et ils peuvent également participer à la propagation de l'infection via leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes [Greenhead et al., 2000].

Si la première cellule rencontrée par le virus est un lymphocyte et pas une cellule dendritique, la réplication démarre dès l'entrée du virus dans cette première cellule cible. Il va y avoir une importante production de virions qui vont pouvoir ensuite propager l'infection à l'ensemble de l'organisme.

Après transmission du virus, suit une phase d'environ 10 jours où le virus est indétectable dans le sang, qui est appelée phase d'éclipse. À ce stade, 80 % des virus détectés dans l'organisme dérivent d'un seul clone viral. Lorsque la réplication s'emballe, on entre alors dans une nouvelle phase : la phase aiguë (ou phase de primo-infection).

b) Phase aigüe de l'infection

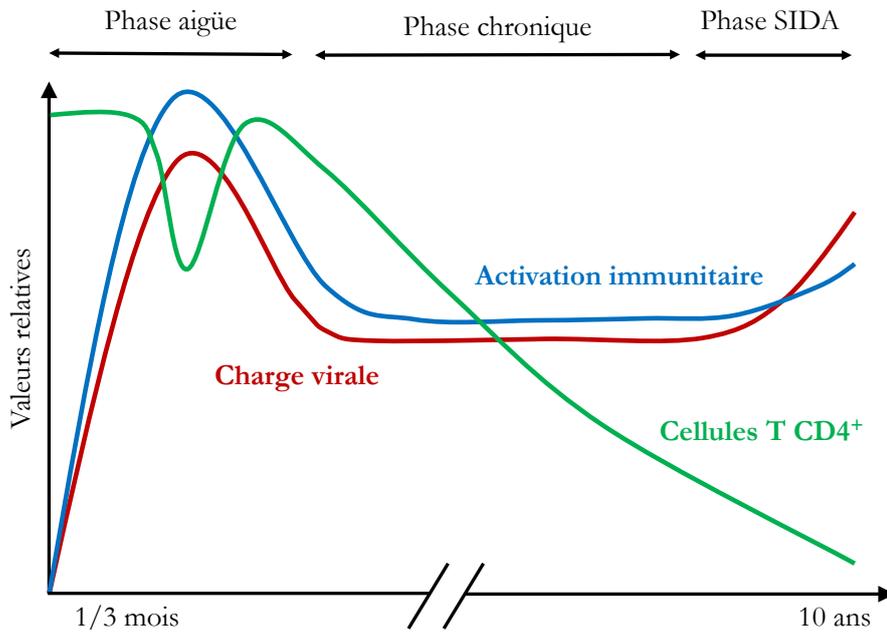


FIGURE 1.2 – **Evolution clinique de l'infection pathogénique par le VIH.** On distingue trois phases lors de l'infection, qu'on caractérise par le nombre de cellules T CD4⁺ par mL de sang, par la charge virale et par l'activation du système immunitaire. La phase aigüe est caractérisée par une forte réplication virale associée à une réponse immunitaire intense. Démarre ensuite la phase chronique, durant laquelle la réplication virale est maintenue à un niveau constant et où on observe une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4⁺. Lorsque le niveau de cellules T s'effondre, la phase d'immunodéficience (SIDA) commence et l'organisme est alors à la merci des infections opportunistes. Le système immunitaire hyperactivé ne parvient pas à compenser ce déficit et la personne infectée décède, en moyenne 10 ans après la contamination.

Lorsque la quantité de virus dans le sang atteint un niveau détectable (mesurée par la quantité d'ARN viral par mL), elle est généralement associée à la présence de symptômes grippaux (fièvre, lymphadénopathie, rash érythémateux ...). Entre 21 et 28 jours après la transmission, le niveau plasmatique d'ARN du VIH atteint un pic (environ 10^6 à 10^7 copies par mL de plasma) avant que la réponse immunitaire se mette en place, ce qui diminuera la quantité de virus par un facteur 100. Durant cette première phase, le nombre de cellules T CD4⁺ chute drastiquement à cause de la forte multiplication virale. Les lymphocytes T CD4⁺ du tube digestif sont les plus affectés, ainsi que ceux des ganglions lymphatiques [Brenchley et al., 2004]. Les lymphocytes T CD8 sont parmi les premiers acteurs à avoir une forte action anti-VIH. Ils sont détectés avant qu'on détecte les anticorps circulants (séroconversion), ou que des anticorps neutralisants soient produits [Goonetilleke et al., 2009]. Une forte réponse

immunitaire innée va également se mettre en place. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) détectent la présence d'ARN viral via le TLR (Toll-Like Receptor) 7 et sécrètent de fortes quantités d'interféron de type I. Cela induit l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISG) qui confèrent un statut antiviral aux cellules et ralentissent fortement la réplication du virus (cf partie II.). Les cellules dendritiques conventionnelles (DC) sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques où elles font de la présentation d'antigène afin d'activer les lymphocytes B, T CD4 et T CD8 et les cellules NK [McMichael et al., 2010]. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IL-12 par les lymphocytes CD4 contribue à l'activation des cellules NK (Natural Killer), qui détectent et lysent les cellules infectées. À partir de 3 à 5 mois après la transmission du virus, un équilibre est atteint entre réplication du virus et activation du système immunitaire [McMichael et al., 2010].

On atteint un état stationnaire qui sera maintenu dans la phase chronique (cf figure 1.2). La charge virale atteinte à ce stade est fortement corrélée avec l'évolution de la maladie et la progression vers le SIDA : plus la charge virale est élevée, plus les personnes infectées progressent rapidement vers le SIDA et la mort en l'absence de traitement antirétroviral [Mellors et al., 1996].

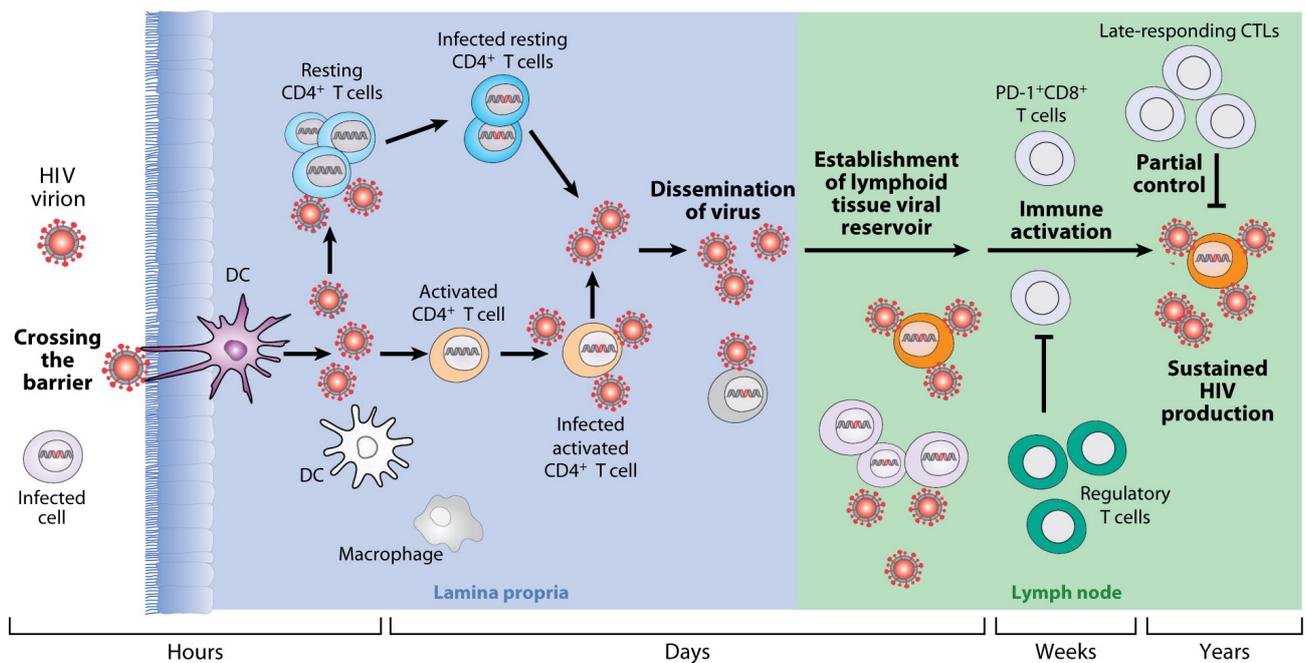


FIGURE 1.3 – Différents acteurs cellulaires sont impliqués au cours de l'infection par le VIH. L'infection commence par la transmission à travers la barrière muqueuse. Une première propagation de faible importance se produit probablement dans les lymphocytes T CD4⁺, suivie par une prolifération massive du virus dans le tissu lymphoïde du système digestif. S'ensuit la dissémination du VIH aux autres organes lymphoïdes secondaires et l'établissement de réservoirs viraux. La réponse immunitaire peine à rattraper le pic de virémie et ne procure qu'un contrôle partiel de la réplication. [Moir et al., 2011]

c) Phase asymptomatique

Lorsque les symptômes disparaissent à la fin de la phase aigüe, il semble que l'infection a été maîtrisée par l'organisme. Cependant, la charge virale est toujours détectable (environ 10^4 copies d'ARN viral par mL de plasma) et le système immunitaire reste activé [Fiebig et al., 2003], [Ford et al., 2009]. La persistance de l'activation immunitaire est caractérisée par un renouvellement accru des lymphocytes T, monocytes et cellules NK [Hazenbergh et al., 2000]. Une forte apoptose des lymphocytes T CD4 et CD8 et une activation des lymphocytes B est également détectée. En effet, durant cette période, le virus continue sa réplication dans les organes lymphoïdes en particulier dans le tissu lymphoïde du tube digestif (GALT). Une infection massive des lymphocytes T CD4, des macrophages et des cellules dendritiques des ganglions lymphatiques persiste [Embretson et al., 1993] et illustre la difficulté qu'a le système immunitaire à éliminer le virus. On assiste ainsi à l'établissement de réservoirs de virus dans les tissus lymphoïdes (cf figure 1.3). Bien qu'il n'y ait pas de consensus dans le domaine, certaines études ont proposé qu'il faudrait entre 7 et 60 ans à un patient sous thérapie pour éliminer le VIH de ce réservoir viral [Zhang et al., 1999], [Siliciano et al., 2003].

La mort des lymphocytes T CD4 peut être liée directement aux effets cytopathiques de la réplication virale, à une apoptose induite par le virus, ou à la destruction des organes lymphoïdes qui résulte de l'hyperactivation immunitaire. Entre la mort des lymphocytes T et le défaut de maturation des lymphocytes B lié à l'élimination d'un environnement immun favorable, plus de 50% des centres germinaux du tube digestif sont perdus durant les 80 premiers jours de l'infection [Levesque et al., 2009]. Afin de compenser, le système immunitaire produit sans cesse de nouvelles cellules T CD4. On observe un épuisement au fur et à mesure que la capacité de régénération des cellules naïves et mémoire décline malgré une forte concentration de cytokines homéostatiques dans le sang.

Le virus, quant à lui, se réplique toujours mais il est désormais soumis à une forte pression de sélection de la part du système immunitaire (lymphocytes T CD8 cytotoxiques, anticorps neutralisants...) [Wei et al., 2003]. Ainsi, alors que lors de la primo-infection on a très majoritairement une population dérivant d'un seul clone viral, de nombreuses sous-populations apparaissent lors de cette phase asymptomatique [Moir et al., 2011]. On observe également chez certains patients un changement de tropisme avec l'utilisation du corécepteur CXCR4 plutôt que CCR5, dont le mécanisme est inconnu [Sagar, 2014].

Ce conflit hôte-pathogène entre le virus et les défenses de l'individu infecté oblige le système immunitaire à fonctionner en sur-régime et conduit à son épuisement. Cela est caractérisé par la diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4 (cf figure 1.2). L'épuisement de l'immunité autorise alors l'apparition d'infections opportunistes.

d) Phase SIDA

Après un temps de latence variable d'environ 10 ans où le nombre de cellules T CD4 diminue lentement, des symptômes réapparaissent et les infections opportunistes commencent à s'installer. Le CDC américain considère qu'un patient est atteint du SIDA s'il y a présence d'une infection au VIH associée soit à un nombre de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cellules par μL , soit à une complication liée à une infection opportuniste (infections bactériennes récurrentes, candidoses, tuberculose, pneumonies récurrentes, sarcome de Kaposi ...)[Schneider et al., 2008]. Chez un patient sain, les lymphocytes T CD4 représentent plus de 500 cellules par μL . Lors des premiers cas de SIDA décrits dans les années 80, les affections caractérisées étaient surtout des sarcomes de Kaposi et des pneumonies dues à *Pneumocystis carinii*. Aujourd'hui, c'est la tuberculose qu'on observe le plus souvent chez les patients en phase SIDA [Corbett et al., 2003]. L'évolution naturelle de la maladie est majoritairement constatée dans les pays en voie de développement où les populations n'ont pas accès aux multithérapies.

e) Traitements antirétroviraux et résistances naturelles

Le VIH étant un virus qui mute très rapidement [Overbaugh and Bangham, 2001], la stratégie pour le traiter est basée sur les multithérapies (HAART = Highly Active AntiRetroviral Therapy). Ainsi, en contraignant le virus à diverses étapes du cycle viral (cf partie A.), on minimise les chances qu'un mutant capable de se répliquer apparaisse. Il existe 5 grands types d'inhibiteurs du virus : les NRTI (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) et les NNRTI (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) s'opposent à l'étape de transcription inverse ; les ISTI (Integrase Strand Transfer Inhibitors) empêchent l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte ; les inhibiteurs de protéase entravent la maturation de la particule virale ; les inhibiteurs d'entrée s'opposent à l'entrée du virus dans les cellules cibles [Deeks et al., 2015]. L'utilisation des multithérapies permet de diminuer le nombre de virus présents dans le sang à des niveaux inférieurs aux seuils de détection (<50 copies d'ARN par μL de plasma). Mais, en raison de la présence de réservoirs viraux, le traitement doit être pris à vie. En effet, l'arrêt du traitement entraîne une réaugmentation forte du nombre de virus dès 2 semaines [Davey et al., 1999].

Le traitement est assez onéreux (135\$ par an en Afrique sub-saharienne). En raison de ces coûts, et bien que des efforts aient été faits pour permettre à un grand nombre de personnes d'accéder aux traitements, des disparités importantes dans l'accès aux soins subsistent entre les pays de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) et le reste du monde (cf figure 1.4). De plus, les médicaments proposés présentent une toxicité non-négligeable à cause des temps très longs pendant lesquels ils sont administrés. À cause de ces limitations, la recherche de vaccins et de traitements curatifs connaît un fort intérêt. Pour tenter de développer ces nouvelles thérapies, l'étude de patients naturellement résistants apporte de précieuses informations.

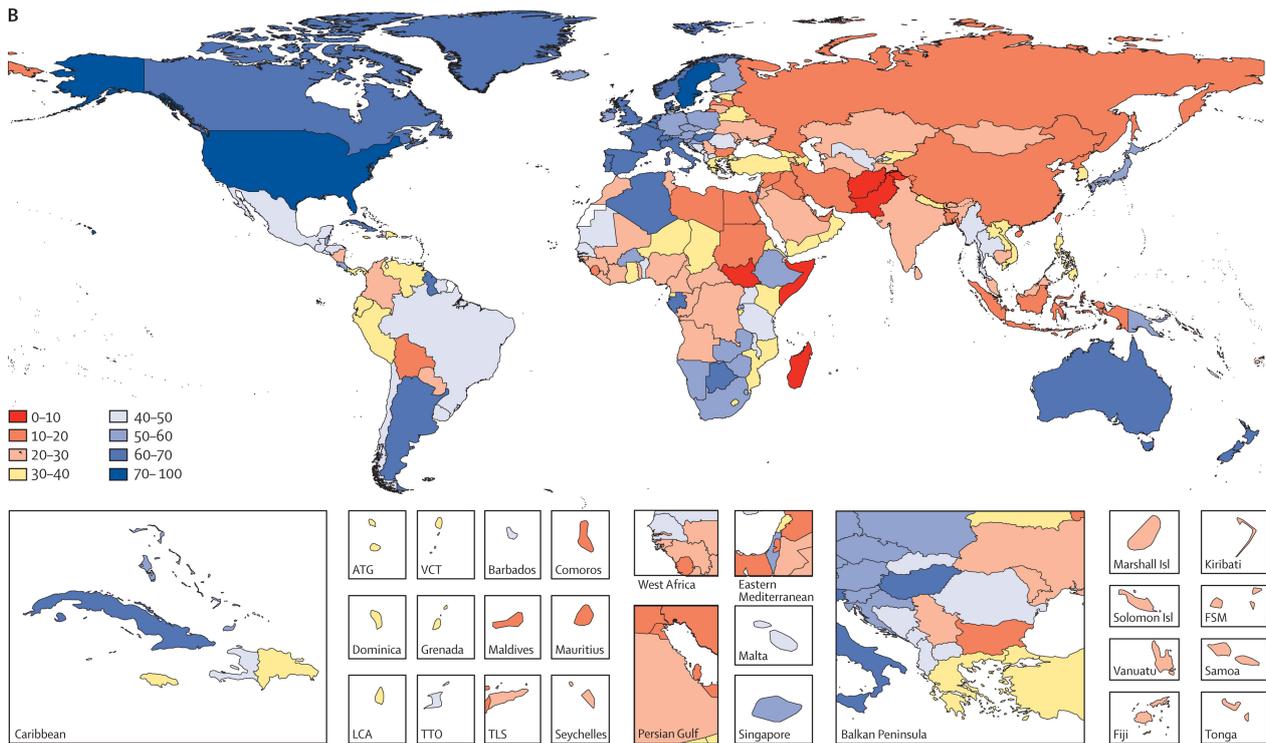


FIGURE 1.4 – Pourcentage de personnes infectées par le VIH ayant accès à une thérapie antirétrovirale en 2015 [GBD 2015 HIV Collaborators, 2016]

Il existe plusieurs cas de patients infectés n'évoluant pas vers la phase SIDA : les contrôleurs d'élite, les contrôleurs virémiques et les LNTP (Long Term Non Progressor) [Okulicz et al., 2009].

	Contrôleur d'élite	Contrôleur virémique	LTNP
Nombre de lymphocytes T CD4 (cellules/ μ L)	>350	>350	>350
Charge virale (copies/ μ L)	<50	50-200	>2000
Durée de l'infection (années)	*	*	>7

TABLE 1.2 – Définitions des différents types de résistances naturelles au VIH (adapté de [Gaardbo et al., 2012])

La caractéristique commune à ces patients est qu'ils possèdent tous un taux de lymphocytes CD4 normal jusqu'à 10 ans après l'infection (cf table 1.2). En s'intéressant de plus près à la charge virale, on constate que certains d'entre eux ont une charge virale faible ou contrôlée (respectivement les contrôleurs d'élite et les contrôleurs virémiques) tandis que certains possèdent une charge virale élevée (LTNP). D'un point de vue immunologique, les contrôleurs et les non-progresseurs présentent une activation immune inférieure à celle observée pour la majorité des patients [Bello et al., 2009]. L'architecture des organes lymphoïdes est préservée et une forte réponse spécifique de type CD8 est observée,

ce qui est associé à un meilleur contrôle de la virémie [Borrow et al., 1994]. A l'échelle moléculaire, une mutation naturelle du corécepteur CCR5 est associée à une entrée ralentie du virus dans les cellules, ce qui conduit à une mauvaise propagation de l'infection et à une survie accrue des patients.

Bien que de nombreux efforts soient effectués afin de comprendre comment les non-progresseurs peuvent résister à la maladie, à ce jour, aucune des découvertes n'explique complètement le contrôle de l'infection chez ces patients.

C. Histoire évolutive du VIH

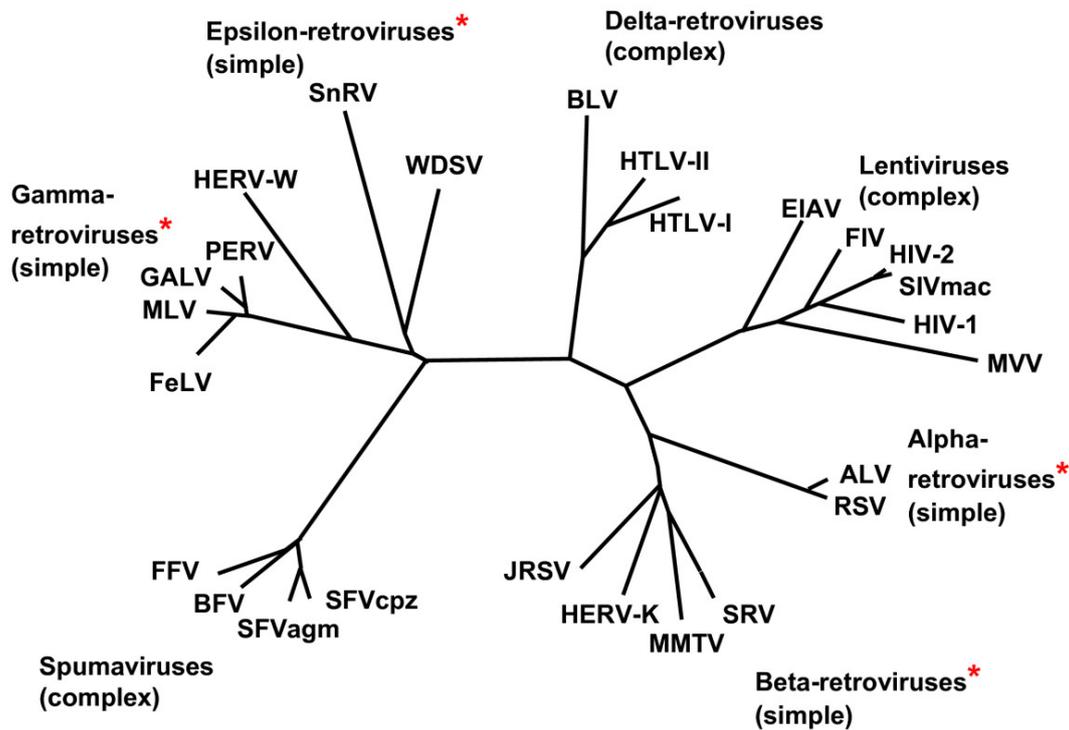


FIGURE 1.5 – **Phylogénie des rétrovirus.** Les rétrovirus endogènes sont marqués d'une astérisque [Weiss, 2006]

Les *Retroviridae* sont une famille de virus à ARN monocaténaire de polarité positive. Ce sont des virus enveloppés infectant les vertébrés. La caractéristique de la famille est la présence d'une enzyme, la transcriptase inverse, qui permet de synthétiser de l'ADN simple brin puis double brin à partir d'un génome ARN. Ils possèdent également une intégrase qui permet aux virus d'incorporer leur génome dans celui de la cellule-cible (stade de provirus). On distingue deux sous-familles : les *spumavirinae* (spumavirus) et les *orthoretrovirinae* (gamma-retrovirus, epsilon-retrovirus, delta-retrovirus, lentivirus, alpha-retrovirus et beta-retrovirus) (cf figure 1.5). Les spumavirus (ou foamy virus en anglais) tirent leur nom de l'aspect mousseux des cellules infectées, caractérisées par de larges vacuoles. Les *ortho-*

retrovirinae comportent de nombreux virus oncogènes (HTLV, BLV, MLV) et les lentivirus, auxquels appartiennent les VIH qui nous intéressent particulièrement.

Les lentivirus tirent leur nom de l'évolution lente de la maladie qu'ils déclenchent chez l'homme et les mammifères. On les retrouve chez les chevaux, les ruminants, les bovins, les carnivores, les primates prosimiens et les primates simiens [Gifford, 2012]. Ils sont classés en 5 types de lentivirus exogènes qui correspondent au groupe d'hôte qu'ils infectent (cf table 1.3). Pour chaque groupe, il existe une espèce "type" dont le virus associé est le plus étudié de la famille. Contrairement au VIH-1 pour l'homme, tous ne sont pas pathogènes et certains sont même parfaitement adaptés à l'hôte, comme le BIV [Suarez et al., 1993] ou la plupart des SIV [Villinger et al., 1996], [Pandrea et al., 2008].

Groupe d'hôtes	Espèce type	Transmission	Récepteur
Équidés	EIAV	Piqûre d'insecte, sang, sexe et verticale	ELRI
Petits ruminants	OMVV	Salive et/ou aérosols, sang, sexe et verticale	-
Bovins	BIV	Salive et/ou aérosols, sang, sexe et verticale	-
Félins	FIV	Sang, sexe et verticale	CD134
Primates	VIH-1	Sang, sexe et verticale	CD4

TABLE 1.3 – Lentivirus exogènes et espèces type pour chaque groupe (adapté de [Gifford, 2012])

Pour le groupe des primates, c'est le VIH-1 qui est le plus étudié depuis sa découverte en 1983 (cf partie A.). Les primates non-humains d'Afrique sont nombreux à être infectés par des lentivirus SIV correspondant à leur espèce, tandis qu'il n'a été isolé de lentivirus ni chez les singes d'Asie, ni chez les singes du nouveau monde (NWM = New World Monkeys). Sur les 73 espèces référencées de primates non humains en Afrique, plus de 40 possèdent un SIV propre à l'espèce. Bien que la plupart d'entre eux conduisent à une infection non-associée à une progression vers le SIDA, des cas isolés de progression vers l'immunodéficience ont été décrits chez des chimpanzés [Etienne et al., 2011]. Ces cas sont encore peu décrits, puisqu'il est très difficile d'accéder à des données en nombre important sur des populations sauvages de singes, mais la comparaison entre l'évolution pathogène ou non chez les différentes espèces de singes et chez l'homme permet d'obtenir de précieuses informations sur les interactions hôte-pathogène.

En comparant les séquences génomiques des différents lentivirus de primates, on peut les répartir en 5 lignages (cf figure 1.6) :

- Les SIV_{cpz} des chimpanzés (*Pan troglodytes*) et le VIH-1 humain
- Les SIV_{sm} des mangabeys couronnés (*Cercocebus atys*), les SIV_{mac} de macaques (genre *Macaca*) et le VIH-2
- Les SIV_{agm} de 4 espèces de singes verts d'Afrique (genre *Chlorocebus*)
- Les SIV_{syk} des singes de Syke (*Cercopithecus albogularis*)

- Les SIV_{thoest} des singes de l'Hoest (*Cercopithecus lhoesti*), les SIV_{sun} des singes à queue de soleil (*Cercopithecus solatus*) et les SIV_{mnd} des mandrills (*Mandrillus sphinx*)

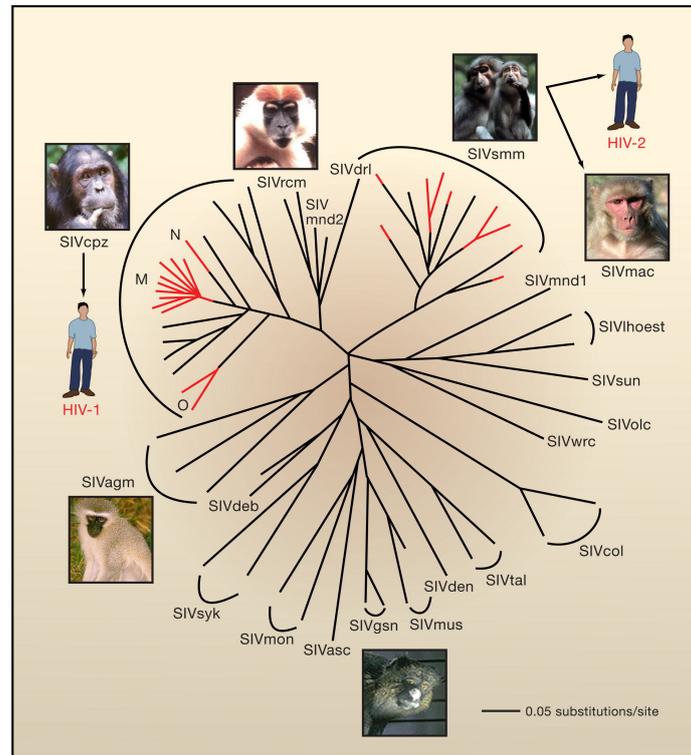


FIGURE 1.6 – **Phylogénie des lentivirus de primates, incluant VIH-1 et VIH-2 (en rouge).** Le VIH-1 groupes M et N dérive du SIV de chimpanzé (SIV_{cpz}). Le SIV de gorille est à l'origine du VIH-1 groupe O. Le VIH-2 et le SIV de macaques rhésus (SIV_{mac}) dérivent du SIV de mangabey couronné (SIV_{smm}). [Ho and Bieniasz, 2008]

On peut tirer beaucoup d'informations de la comparaison des séquences des différents lentivirus de primates. Les différents SIV d'une espèce de primates non humains sont plus proches phylogénétiquement au sein de l'espèce qu'entre deux espèces, c'est-à-dire que les SIV forment des clusters hôte-spécifique au sein de l'arbre phylogénétique. Cela implique que les virus d'une espèce ont subi une pression de sélection de la part de leur hôte et que cela a conduit à une forte similarité entre les différents virus d'un même hôte. Il est établi que la divergence des lignages viraux est due à la divergence des lignages des espèces hôtes [Hahn et al., 2000].

Les virus, bien qu'adaptés à leur hôte, peuvent parfois traverser la barrière d'espèce et infecter des espèces proches. C'est ce qui s'est produit pour le VIH-1 et le VIH-2, dont on sait qu'ils ont été transmis à plusieurs reprises à l'homme au début du XXème siècle, depuis différentes souches de SIV. Le VIH-1 comprend 4 groupes : M, N, O, P. Les groupes M et N proviennent de transmissions à l'homme de SIV de chimpanzé [Gao et al., 1999], [Keele et al., 2006]. Les groupes O et P, quant à eux, sont issus de SIV de gorille [Van Heuverswyn et al., 2006], [Plantier et al., 2009]. Le VIH-2 comprend 8 clades

(A à H) qui résultent de transmissions indépendantes de SIV de mangabey couronné à l'homme. Ces différentes souches de VIH n'ont pas la même histoire épidémiologique, puisque seul le VIH-1 groupe M s'est diffusé mondialement et qu'il est responsable de la pandémie (plus de 60 millions d'infections dans le monde depuis la découverte du VIH).

Les différents VIH observés chez l'homme dérivent d'au moins 12 transmissions zoonotiques indépendantes de singes d'Afrique vers l'homme. Ces transmissions sont possibles par une combinaison de facteurs comportementaux et immunitaires chez l'homme. L'exposition au sang et aux sécrétions d'animaux infectés se fait lors de la chasse, du découpage de viande de brousse ou par morsure/griffure [Locatelli and Peeters, 2012]. Plus le nombre d'expositions et la quantité de virus présents chez les singes sont grands, plus les chances de transmission à l'homme sont importantes. Cependant, le fait d'être au contact d'un nouvel hôte (l'homme) ne suffit pas pour que le virus soit infectieux dans cette autre espèce. La présence de récepteurs cellulaires d'entrée est un prérequis essentiel et la conservation de ces récepteurs favorise la transmission inter-espèce (comme c'est le cas pour le chimpanzé et l'homme [Fomsgaard et al., 1992]). Mais on sait également qu'un certain nombre de facteurs de restriction (cf partie II. C.) représentent des obstacles à la transmission d'une espèce à une autre et notamment des singes vers l'homme [Hatzioannou and Bieniasz, 2011]. Lorsqu'un virus mutant capable de résister à ces facteurs de restriction est transmis à l'homme, il peut se répliquer dans son nouvel hôte et c'est alors l'apparition d'un nouveau virus humain.

D. Structure et génome du VIH

D.1. Le génome des lentivirus humains

Le VIH-1 et le VIH-2 possèdent une organisation génétique proche avec un génome d'environ 9kb (9,2 pour le VIH-1 et 9,7 pour le VIH-2, cf figure 1.7). Les extrémités du génomes sont des régions non-traduites appelés LTR (Long Terminal Repeat) et qui agissent en cis pour l'initiation de la traduction. Ils se divisent en 3 régions, U3, R et U5 et c'est U3 qui joue le rôle de promoteur pour les protéines virales. Le reste de l'ARN génomique code pour les différentes protéines du virus. Les 3 principaux gènes du virus sont *gag*, *pol* et *env* qui codent respectivement pour les protéines structurales, les enzymes virales et les protéines d'enveloppe.

La protéine Gag (Group specific antigen) est une polyprotéine qui sera clivée en :

- la nucléocapside (NC) qui s'associe à l'ARN viral et participe à son encapsidation
- la capsid (CA) qui constitue le core viral
- la matrice (MA) qui interagit avec l'enveloppe et compose un maillage sous la membrane virale.

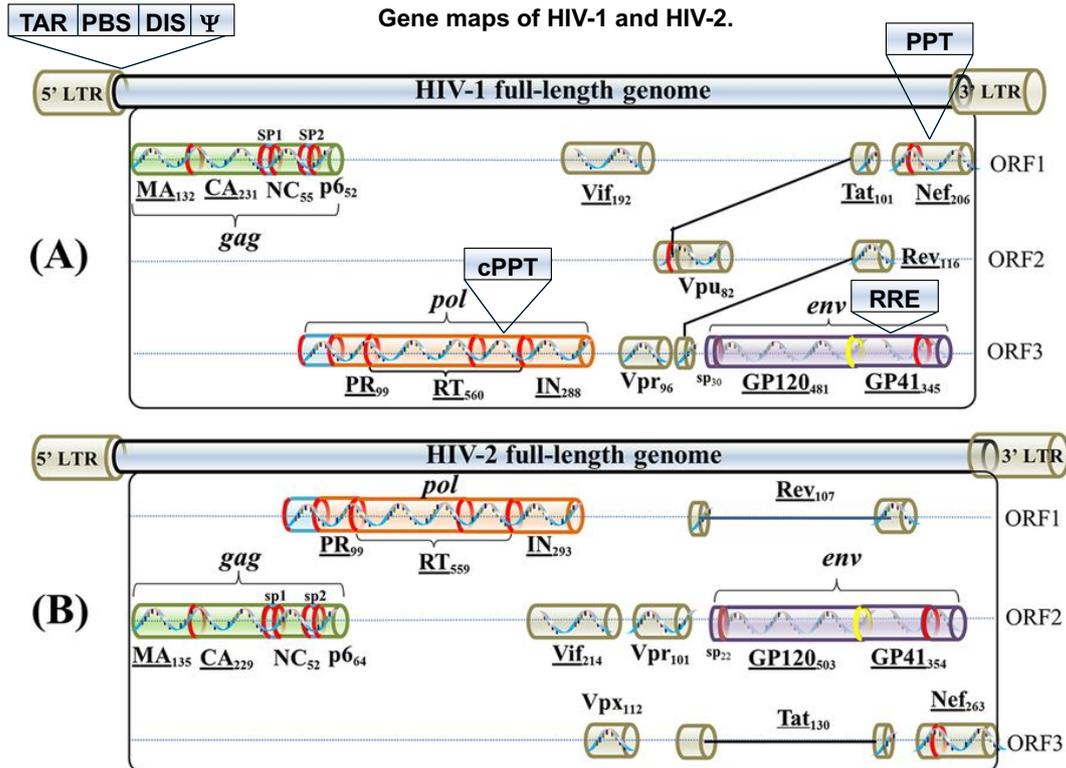


FIGURE 1.7 – **Structure génétique du génome des VIH-1 et VIH-2** Le génome des VIH-1 et 2 contient les gènes communs à tous les rétrovirus : *gag*, *pol* et *env*. Ils codent également pour les protéines régulatrices Rev et Tat et pour les protéines auxiliaires Vif, Nef, Vpr et Vpu/Vpx. Plusieurs séquences particulières organisent l'ARN viral : les séquences TAR et DIS, le PBS, les régions PPT et cPPT, la boucle ψ et la séquence RRE (adapté de [Li and De Clercq, 2016])

Elle génère également 3 peptides, Sp1 (Spacer peptide 1), Sp2 et P6 (Peptide 6). P6 va participer au recrutement du complexe ESCRT impliqué dans l'étape de bourgeonnement cellulaire [Freed, 2015].

La polyprotéine Pol comporte les enzymes virales. Après clivage, elle conduit à :

- la protéase (PR), qui va permettre le clivage des polyprotéines virales
- la transcriptase inverse (RT), enzyme caractéristique de la famille des rétrovirus, qui va permettre d'obtenir l'ADN viral à partir de l'ARN
- l'intégrase (IN) qui permet l'insertion du génome viral dans l'ADN de l'hôte.

La protéine d'enveloppe, qui dérive du gène *env* est clivée par une protéase cellulaire cette fois-ci, la furine, en deux protéines gp41 (transmembranaire) et gp120 (protéine de surface).

Le reste du génome viral code pour les protéines régulatrices (Tat et Rev) et pour les protéines auxiliaires (Vif, Vpr et Nef pour les deux virus ; Vpu pour le VIH-1 et Vpx pour le VIH-2). La différence

majeure entre les deux virus est la présence de Vpu chez le VIH-1 et Vpx chez le VIH-2.

La structure tridimensionnelle de l'ARN viral joue également un rôle important dans le cycle viral [Kuzembayeva et al., 2014] :

- La séquence DIS permet la dimérisation des ARN viraux et autorise ainsi les recombinaisons entre les différents sous-types viraux
- La séquence TAR est importante pour la traduction
- La région PBS (Primer Binding Sequence) contient la région où la transcriptase inverse se lie à l'ARN
- La boucle ψ se lie à la protéine NC et permet l'encapsidation du virus.
- Les séquences PPT et cPPT qui jouent un rôle lors de la transcription inverse
- La région RRE (Rev Responsive Element) qui permet l'export nucléaire des ARN génomiques.

D.2. Morphologie et composition du VIH

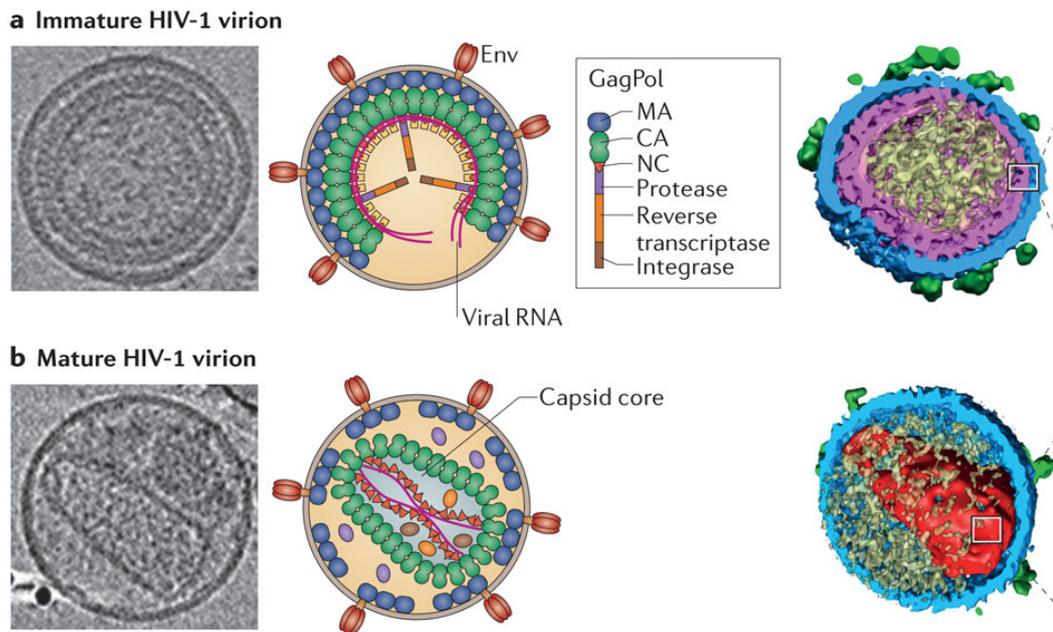


FIGURE 1.8 – **Structure des virions du VIH** (a) Particule virale immature (b) Particule virale mature. De gauche à droite : cryo-électromicroscopie, représentation schématique et cryotomographie électronique [Freed, 2015]

Le VIH est un virus enveloppé quasi-sphérique d'environ 120 nm de diamètre (60 fois plus petit qu'un érythrocyte) [Barré-Sinoussi et al., 1983]. Il possède donc une membrane dans laquelle sont

enchâssées les protéines d'enveloppe (gp41), au sein de laquelle une capsule conique, le core viral, renferme l'ARN génomique (cf figure 1.8).

La polyprotéine Gag, exprimée seule, est capable de conduire à la production de pseudo-particules virales non-infectieuses. Pour que les particules soient infectieuses, il faut que la protéase virale clive Gag. La maturation de Gag par clivage protéique conduit à un changement de morphologie du virion, comme on peut l'observer sur les images de cryotomographie électronique de la figure 1.8. Dans les particules immatures (a), Gag (en vert) est organisé de façon radiale sous la membrane du virus. Lorsque la protéase clive Gag, libérant les protéines de capsid (CA), le core conique appelé également capsid se forme (b). Ce core est composé d'hexamères de CA, qui composent la majeure partie du cône et de 12 pentamères qui ferment les extrémités (7 à l'extrémité large et 5 de l'autre côté). La matrice (en bleu) forme un maillage sous la membrane et interagit avec les protéines d'enveloppe gp41 (orange). Gp120 et gp41 forment des trimères à la surface des virus matures, à raison d'une quinzaine par virus [Zhu et al., 2006].

Au sein de la capsid, on trouve les 2 ARNs génomiques dimérisés (en rose) étroitement associés à la nucléocapsid (triangles oranges) qui les protège. On trouve également les enzymes virales intégrase (marron), transcriptase inverse (orange) et protéase (violet). Les protéines auxiliaires sont présentes également (Vif, Nef, Vpr) et vont servir à manipuler l'hôte au bénéfice du virus, le plus souvent via la dégradation de protéines cellulaires [Strebel, 2013].

Puisque les virus sont des pathogènes intracellulaires obligatoires et qu'il existe de nombreuses interactions entre les protéines de l'hôte et les protéines virales, on détecte un certain nombre de protéines cellulaires dans les virions [Ott, 2008]. Certaines sont des protéines membranaires emportées en même temps que la membrane cellulaire (CD46, CD54) d'autres participent à la libération du virus (protéines du complexe ESCRT) et enfin il en existe qui ont un rôle antiviral (APOBEC3G).

Le virus, bien que possédant un génome de petite taille, exploite le moindre nucléotide afin de coder pour 16 protéines virales. Ce n'est pas suffisant pour lui permettre de se répliquer seul et il doit profiter de la machinerie cellulaire pour proliférer.

II. L'hôte : de la cellule cible à la réponse immunitaire innée

A. La cellule, lieu de la réplication virale

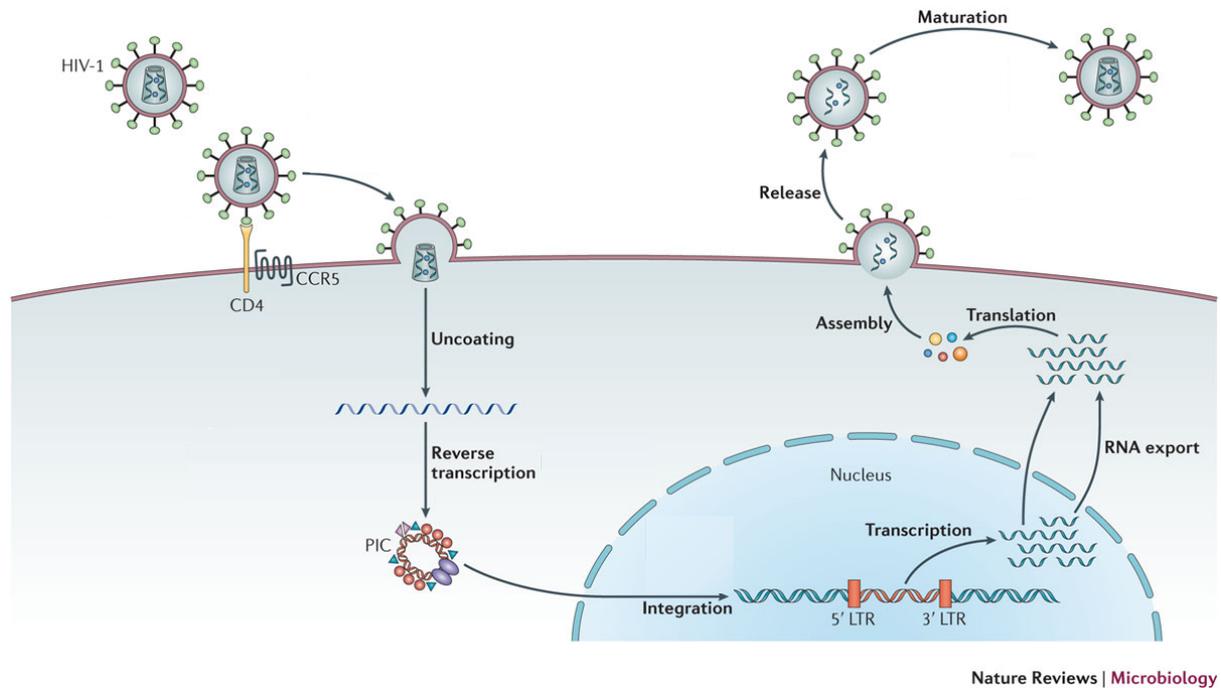


FIGURE 1.9 – Cycle de réplication du VIH adapté de [Barré-Sinoussi et al., 2013]

Afin d'effectuer un cycle de réplication conduisant à la production de nouvelles particules virales, le VIH doit infecter une cellule-cible dont il va détourner un certain nombre de fonctions. Le cycle se décompose en deux parties, appelées phases précoces et phases tardives. Les phases précoces vont de l'entrée du virus dans la cellule hôte à son intégration dans le génome de l'hôte. Les phases tardives commencent avec la transcription de l'ARN viral et se terminent avec la production de nouvelles particules virales matures (cf figure 1.9).

A.1. Phases précoces

a) Attachement du virus à la cellule et entrée

Les principales cellules cibles du VIH sont les lymphocytes T CD4 (cf partie I.B.1.). Les glycoprotéines d'enveloppe du virus, enchâssées dans l'enveloppe virale, sont capables d'interagir avec les récepteurs et corécepteurs cellulaires et de marquer le début du processus d'entrée [Brandenberg et al., 2015]. Cependant, le virus ne possède qu'une quinzaine de trimères d'enveloppe [Chertova et al., 2002], ce qui limite ses chances de s'attacher à un récepteur. La présence de motifs glycosylés sur l'enveloppe permet au virus d'interagir avec divers récepteurs cellulaires qui représentent un attachement auxiliaire

pour le virus : les héparanes sulfates (interaction avec les chaînes latérales chargées positivement de Env), DC-SIGN et d'autres lectines sur les cellules dendritiques [Geijtenbeek et al., 2000]. Ces glycanes forment également une protection de l'enveloppe contre les anticorps de l'hôte, permettant d'échapper à la reconnaissance spécifique par les anticorps neutralisants [Go et al., 2017].

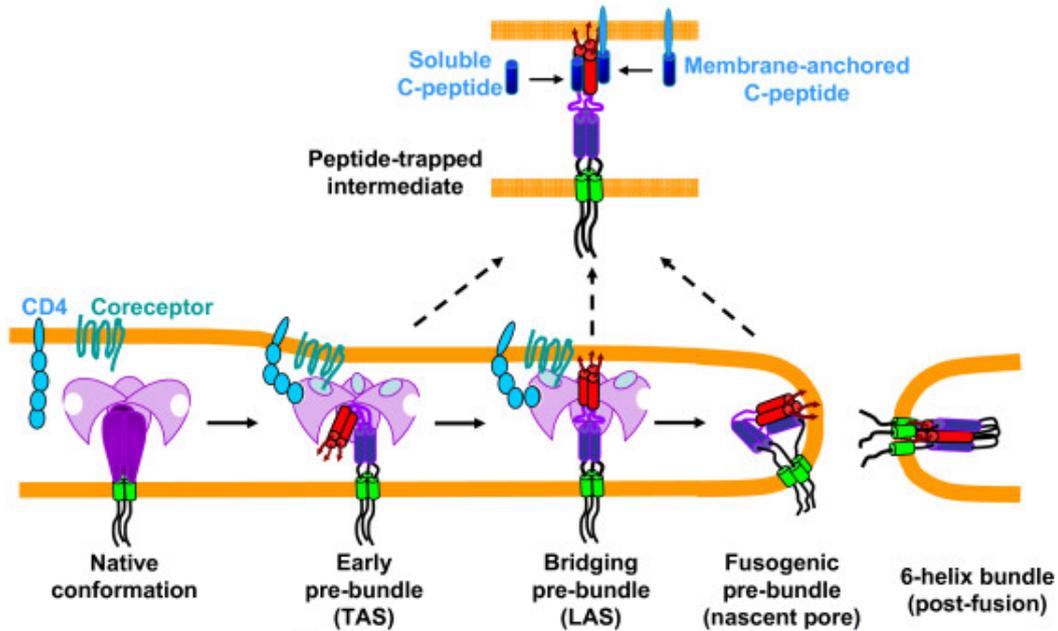


FIGURE 1.10 – **Liaison du virus à son récepteur/corécepteur et fusion des membranes virale et cellulaire** [Melikyan, 2008]

Sur les virions matures, gp120 et gp41 s'associent en hétérodimères non-covalents et trois hétérodimères constituent un trimère méta-stable qui peut se réarranger après stimulation. Gp41 est constitué de 3 domaines majeurs : le domaine extracellulaire (ou ectodomaine), le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (CT pour Cytoplasmic Tail). La plupart des fonctions de gp41 découlent du domaine extracellulaire, composé de 5 régions : le peptide de fusion (FP, en rouge sur la figure 1.10), le NHR (N-terminal Heptad Repeat, cylindre rouge), une boucle, le domaine CHR (C-terminal Heptad Repeat, cylindre violet) et le domaine MPER (Membrane Proximal External Region) [Buzon et al., 2010].

Lorsque l'interaction entre gp120 et CD4 a lieu, elle engage un changement de conformation des trimères d'Env [Pancera et al., 2010]. La réorganisation des trimères de gp120 permet de libérer le domaine d'interaction avec le corécepteur (CCR4 ou CXCR5 selon la souche du virus) [Alkhatib et al., 1996]. Lors de ces changements conformationnels, le domaine NHR sort de sa conformation initiale en trimère pour former le précomplexe en épingle (cf figure 1.10 Early pre-bundle). Après interaction avec le corécepteur, gp120 se dissocie de gp41, permettant à gp41 de se déplier complètement pour libérer le peptide de fusion qui va s'insérer dans la membrane cellulaire. On obtient alors une structure

métastable où les deux membranes cellulaire et virale sont liées par gp41 (cf figure 1.10 Bridging pre-bundle). Les deux trimères vont alors se rapprocher pour former le fuseau à 6 hélices (6-helix bundle), constitué des 3 unités NHR enroulées en superhélice avec les 3 unités CHR ancrées dans les sillons de la superhélice [Chan et al., 1997][Gallo et al., 2001]. En formant ce fuseau à 6 hélices, gp41 va permettre le rapprochement et la fusion des membranes cellulaire et virale. On va alors observer l'hémifusion des membranes, qui va s'étirer pour former un diaphragme d'hémifusion, lequel évolue en pore grâce à l'action des protéines d'enveloppe.

Bien que le processus de fusion soit thermodynamiquement favorisé, les barrières d'activation sont hautes et le processus requiert de l'énergie. L'énergie viendrait de la réorganisation de gp41, qui passe d'un état métastable (conformation native) à un état stable (post-fusion). Il a également été proposé que la participation de plusieurs trimères env-récepteur soit nécessaire pour obtenir la formation d'un pore stable [Muñoz Barroso et al., 1999].

L'entrée du virus dans la cellule peut se faire soit à la membrane plasmique, soit à la membrane des endosomes. Il convient alors de distinguer entrée et entrée productive, puisque de nombreux événements de fusion vont conduire à une infection avortée. La présence des récepteurs et co-récepteurs à la membrane plasmique, ainsi que des micrographies électroniques de virus fusionnant à la surface des cellules sont des indices qui désignent la membrane plasmique comme site d'entrée [Stein et al., 1987]. L'équipe du professeur Melikyan a proposé que les virus entrent via des vésicules d'endocytose dans des cellules épithéliales ou des lymphoblastes [Miyachi et al., 2009]. Une fusion dans les endosomes a également été proposée dans les macrophages [Carter et al., 2011].

Quel que soit le lieu d'entrée, l'étape de fusion conduit à la libération du core viral dans le cytoplasme de la cellule. S'ensuivent alors les étapes de décapsidation (ouverture du core viral), transcription inverse (synthèse de l'ADN viral à partir de l'ARN génomique) et import nucléaire. La cinétique relative de ces différentes étapes est débattue, elles seront donc abordées l'une après l'autre de façon arbitraire.

b) Transcription inverse

FIGURE 1.11 – Structure de la transcriptase inverse du VIH-1 seule (A), en présence d'ADN viral (B) et en présence d'ADN viral et de dNTP (C) adapté de [Hu and Hughes, 2012]. En haut, on retrouve la polymérase de la RT, avec le domaine finger en bleu et thumb en vert. Lorsqu'elle est libre, le pouce (thumb) est fermé vers la paume. En présence d'ADN et de nucléotides, le pouce s'ouvre et les doigts viennent se refermer. Sur la figure du bas ; le domaine RNase H est représenté en jaune et orange.

L'enzyme capable de rétro-transcrire l'ARN génomique viral en ADN est caractéristique de la

famille des Retrovirus. Sous sa forme mature, c'est un hétérodimère qui se compose de deux sous-unités : p66 (560 acides aminés) et p 51 (440 premiers acides aminés de p66) [Lightfoote et al., 1986]. La sous-unité p66 comporte 2 domaines : polymérase et RNaseH, c'est donc elle qui est responsable des deux activités enzymatiques de p66. Le domaine polymérase est souvent comparé à une main, avec un pouce (thumb), des doigts (fingers) et une paume (palm, cf figure 1.11). La sous-unité p51 comporte les mêmes sous-domaines que p66, arrangés différemment et elle joue un rôle structural.

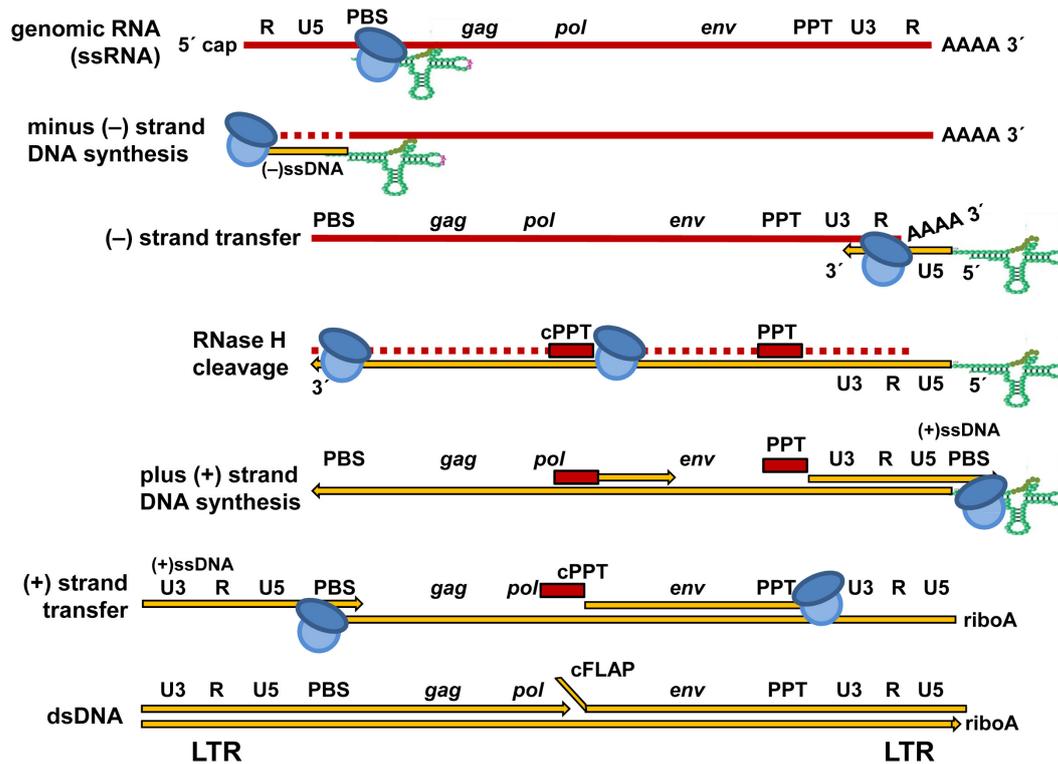


FIGURE 1.12 – Transcription inverse du VIH-1 : obtention de l'ADN double-brin à partir de l'ARN génomique simple brin. L'ARN viral est représenté en rouge, l'ADN en orange, l'enzyme en bleu.[Menéndez-Arias et al., 2016].

La transcription inverse commence dans le virion avec l'incorporation d'un petit nombre de nucléotides [Trono, 1992] et se poursuit dans la cellule-cible. En effet, la transcriptase inverse (RT) possède les deux activités catalytiques nécessaires à la synthèse d'ADN double brin : c'est une polymérase qui fonctionne avec une matrice ADN ou ARN et c'est aussi une RNase qui dégrade l'ARN d'un hybride ARN/ADN. Comme la plupart des ADN-polymérases, la RT a besoin d'une matrice et d'un primer. La transcription inverse commence après liaison d'un ARN de transfert (tRNA) cellulaire au PBS (le Primer Binding Site, cf partie I.D.1.). Pour le VIH-1, il s'agit de l'ARNt Lys3 dont les 18 nucléotides terminaux en 3' s'associent au PBS (nucléotides 182 à 199 du génome viral, cf figure 1.12). La polymérase commence par synthétiser le brin d'ADN du PBS vers l'extrémité 5' de l'ARN génomique, synthétisant ainsi la moitié du LTR (U5-R). L'incorporation des 5-6 premiers nucléotides à la suite de l'ARNt est lente, puis le processus s'accélère [Isel et al., 1996] et permet l'obtention d'un brin d'ADN (-), hybridé à l'ARN génomique.

Cet hybride va permettre à l'activité RNase H de se mettre en place, laissant l'ADN simple brin exposé. La séquence R des LTR est dupliquée aux deux extrémités de l'ARN viral (5' et 3'), permettant à la polymérase d'effectuer un premier saut de brin, de l'extrémité 5' de l'ARN viral vers l'extrémité 3' de ce même ARN. Elle reprend ensuite la synthèse d'ADN depuis la séquence R en 3'. La synthèse

peut reprendre sur le même l'ARN ou sur l'autre matrice ARN [Hu and Temin, 1990]. L'élongation vers l'extrémité 5' de l'ARN génomique s'accompagne d'une dégradation de la matrice par l'activité RNase H de la RT. Il existe 2 zones riches en purines (les PolyPurine Tracts) qui résistent à la dégradation. L'une est située dans la région U3 et l'autre au centre du génome (cPPT, cf figure 1.7). Ces séquences vont servir d'amorces pour la synthèse du brin d'ADN positif et des travaux publiés en 2013 suggèrent qu'elles serviraient aussi à garder les ARN génomiques à proximité l'un de l'autre, afin de faciliter leur recombinaison. Après addition de quelques nucléotides, le PPT est dégradé et la synthèse d'ADN du brin (+) d'ADN continue en direction du 5' de l'ADN (-) jusqu'à atteindre l'ARNt qui avait servi d'amorce pour le brin (-) et qui est donc toujours lié à l'extrémité 5' du brin (-). Cet ARNt va, à son tour, être clivé par l'activité RNase H, en même temps que le brin (+) s'allonge d'une séquence PBS. Un second saut de brin se produit, qui implique l'hybridation du PBS du morceau d'ADN (+) fraîchement synthétisé à partir du PPT vers le PBS en 3' de l'ADN (-). Par élongation à partir de là (avant-dernière étape de la figure 1.12), on obtient un ADN double brin compétent pour l'intégration, avec des LTR identiques à chaque extrémité. L'activité de la RT peut également générer ce qu'on appelle des "flaps", c'est-à-dire des régions où on observe une structure à 3 brins dont deux (+) superposés, au niveau du cPPT. Le rôle fonctionnel de ces flaps est encore inconnu et ils peuvent être enlevés par des endonucléases et ligases cellulaires afin de générer un provirus complet.

La RT n'est pas capable d'activité exonucléolytique 3'→5' dans le cas de nucléotides mal incorporés et elle possède un taux d'erreur intrinsèque de 10^{-4} à 10^{-5} erreurs par base incorporée [Álvarez et al., 2009]. Cela, additionné aux erreurs que peut faire l'ARN polymérase II lors de la synthèse de l'ARN génomique viral, contribue à la forte variabilité des rétrovirus et en particulier du VIH-1.

Le rôle de plusieurs protéines virales et cellulaires dans la bonne réalisation de cette étape de transcription inverse a été caractérisé [Hughes, 2015]. Parmi celles-là, on peut citer la capsid (voir partie c)), qui permettrait à l'ADN viral d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire inné [Rasaiyaah et al., 2013]. La nucléocapside participe également en stabilisant les hybrides ADN/ARN et en aidant la RT à passer les structures secondaires [Buckman et al., 2003]. Du côté des facteurs cellulaires, les dUTPases permettent au virus de moduler son taux de mutations [Chen et al., 2004]. Cependant, il existe d'autres facteurs cellulaires qui ont un impact négatif sur la transcription inverse : SAMHD1 diminue la quantité de dNTPs disponibles dans la cellule [Laguette et al., 2011], APOBEC3G induit une hypermutation du génome [Mangeat et al., 2003] et TRIM5 α limite la stabilité du core viral [Nisole et al., 2004](cf partie C.).

La déstabilisation du core viral qui conduit à son ouverture est une étape importante du cycle de réplication du virus : elle doit se produire au moment opportun pour que la capsid protège le matériel génétique viral le plus longtemps possible, tout en permettant à la suite du cycle de se produire.

c) Décapsulation

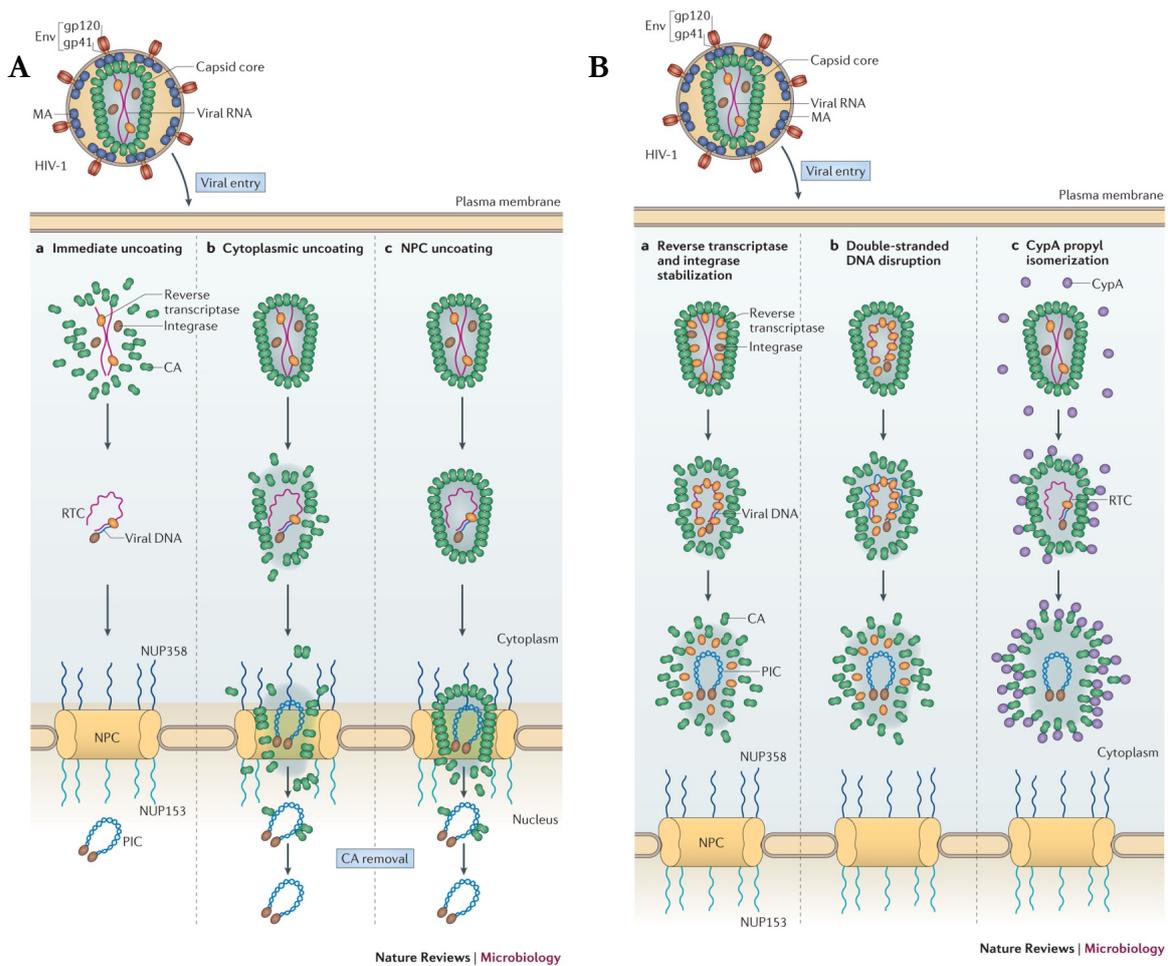


FIGURE 1.13 – A. Différents modèles de décapsulation : a. précoce dès l’entrée dans la cellule b. cytoplasmique et concomitante de la RT c. au niveau du pore nucléaire. B. Facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la déstabilisation du core viral [Campbell and Hope, 2015].

La décapsulation (ou uncoating) du VIH-1 est hautement régulée et joue un rôle critique durant les premières étapes de l’infection. Le core est constitué d’une capside virale conique, composée de la protéine de capside (CA) dans laquelle sont enchâssés les ARN génomiques viraux et les protéines virales associées : la nucléocapside (NC), la transcriptase inverse (RT) et l’intégrase (IN), Vpr et certaines protéines cellulaires comme la Cyclophiline A (CypA) ou APOBEC3G (A3G) [Iordanskiy et al., 2006]. Le complexe intermédiaire obtenu est appelé RTC pour Reverse Transcription Complex et il évoluera à son tour pour former le PIC (Pre-Integration Complex).

De nombreuses études ont tenté de visualiser la décapsulation *in vivo* en utilisant des marqueurs fluorescents ou la microscopie électronique. Alors que l’intégrase et Vpr peuvent être marqués sans altération apparente de leur fonction, il est compliqué de coupler des fluorophores à la protéine de

capside sans endommager sa fonction.

Les premières descriptions de la décapsidation décrivaient cet évènement comme ponctuel. Cependant, des preuves nouvelles ont changé cette vision et il est maintenant clair que la protéine de capsid (CA) a un rôle important pour l'infectivité du virus, à différentes étapes du cycle. Des essais réalisés par plusieurs équipes ont permis de montrer l'accumulation de capsides intactes au niveau du pore nucléaire [Arhel et al., 2007], [Francis et al., 2016]. CA permet au virus d'infecter des cellules ne se divisant pas, ce qui différencie les lentivirus des autres rétrovirus [Yamashita et al., 2007]. Il semblerait que la décapsidation ait lieu en deux étapes : une déstabilisation du core dans le cytoplasme, qui lui permet d'être suffisamment petit pour passer le pore nucléaire, puis un import du RTC dans le noyau, toujours associé à CA. En effet, un pore nucléaire mesure environ 39 nm de diamètre, ce qui est bien inférieur aux 50-60 nm d'un core intact [Panté and Kann, 2002]. De plus, on retrouve des protéines de CA associées au RTC dans le noyau [Peng et al., 2014]. Ceci a conduit à éliminer l'hypothèse d'une décapsidation complète dans le cytoplasme (cf figure 1.13 A.a. Immediate uncoating). Des méthodes de sensibilité à TRIM-Cyp et de marquage de RTC par nucléotides fluorescents ont permis de montrer un pic d'ouverture du core vers 3-4 heures après infection, alors que le pic d'activité de la RT se situe plutôt vers 8-12h post-infection [Arfi et al., 2009]. De plus une étude récente a proposé que la décapsidation s'amorce après le premier transfert de brin de la RT [Cosnefroy et al., 2016]. Ces observations sont en faveur du modèle "Cytoplasmic uncoating" (cf figure 1.13 A.b.). D'autres éléments, comme le rôle protecteur de CA contre les protéines et senseurs cellulaires paraissent difficilement conciliables avec cette hypothèse. Ainsi, comment la capsid protégerait-elle le génome viral si le core s'effondre progressivement ? Cela a conduit à proposer le modèle "NPC uncoating" (cf figure 1.13 A.c) où la décapsidation a lieu au niveau du pore viral. Cependant, des incohérences cinétiques apparaissent avec ce modèle et il convient de le considérer avec précaution.

Un nouveau test d'entrée développé dans l'équipe, le test EURT (Entry/Uncoating assay based on core-packaged RNA availability and Translation) a permis de mettre en évidence 2 comportements du core viral [Da Silva Santos et al., 2016]. Ainsi, le core viral peut s'ouvrir rapidement, ce qui conduit à une infection avortée (probablement parce que le matériel génétique viral est très exposé aux protéines cellulaires), ou rester fermé, ce qui va donner une infection productive. Dans le cas d'une infection productive, la RT module l'ouverture du core, mais l'association de CA avec le génome viral le protège des protéines cellulaires.

L'ouverture du core en association avec la RT peut s'expliquer en partie par la synthèse d'un ADN double-brin peu flexible comparé à l'ARN simple brin génomique et qui va nécessiter une réorganisation du core viral pour s'en accommoder. Les composants viraux ne sont cependant pas les seuls à moduler l'ouverture du core. La cyclophiline A (CypA), une peptidyl-prolyl isomérase interagit avec la capsid et joue un rôle essentiel pour l'infectivité du virus, très probablement lors de l'étape de décapsidation.

Cependant, le mécanisme est encore inconnu : il existe des études montrant une stabilisation du core par CypA [Shah et al., 2013] et d'autres montrant au contraire une déstabilisation *in vitro* [Fricke et al., 2013]. Le rôle précis de CypA dans l'infection reste à déterminer.

Depuis que des études ont montré le rôle de CA dans la fin des phases précoces du cycle viral (import nucléaire, intégration) [Matreyek et al., 2013], [Da Silva Santos et al., 2016], il apparaît évident que CA joue un rôle plus vaste que la simple encapsidation du génome viral.

d) Import nucléaire

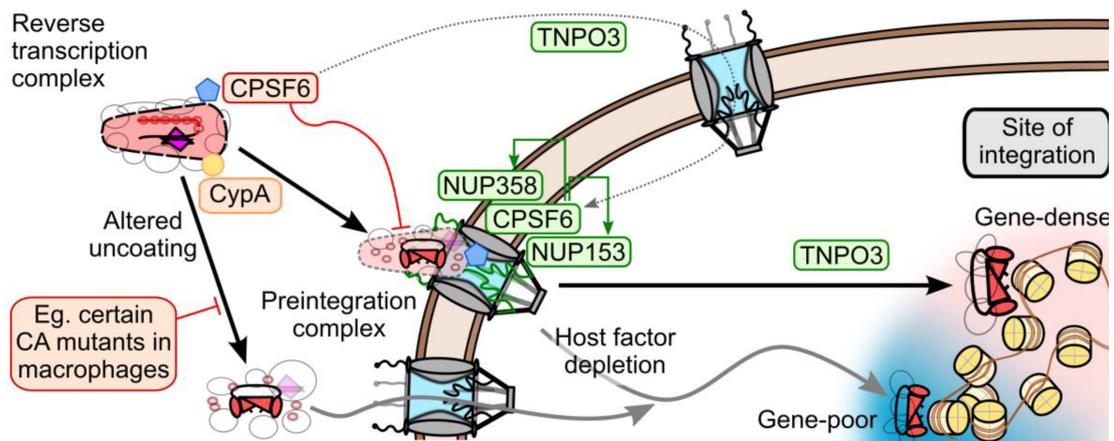


FIGURE 1.14 – **Modèle d'import nucléaire et rôle des cofacteurs cellulaires pendant l'infection par le VIH-1.** Nup358, Nup153 et CPSF6 à l'orée du pore participent au passage du PIC via interaction avec la capsid. TNPO3 est requis également pour permettre la localisation nucléaire de CPSF6. [Matreyek and Engelman, 2013].

Le VIH-1 est capable d'infecter des cellules qui ne se divisent pas et pour cela il entre dans le noyau via les pores nucléaires. De plus, puisque le PIC excède largement la taille des molécules capables de traverser le pore nucléaire, il est généralement admis que l'import nucléaire du PIC du VIH-1 est un processus actif qui nécessite un apport d'énergie et qui est dirigé par plusieurs facteurs viraux (CA, MA, Vpx, IN et cPPT) et cellulaires. MA et IN possèdent des signaux de localisation cellulaire (NLS) et il a été proposé que ces protéines soient impliquées dans l'import nucléaire. La protéine Vpr n'a pas de NLS classique, mais elle est capable d'importer des protéines dans le noyau et on la retrouve associée à l'enveloppe nucléaire. Cependant, le rôle de ces trois protéines dans l'import nucléaire a été remis en question et leur implication dans l'import nucléaire reste sujet à controverse. Une étude de 2009 réalisée au laboratoire a montré que l'import nucléaire n'était pas affecté par l'absence de MA, IN et Vpr. Seul le retrait du cPPT avait un effet en diminuant la cinétique d'import nucléaire et cet effet est observé surtout dans les cellules mononucléaires du sang [Rivière et al., 2010].

La capsid, comme on l'a déjà vu dans la partie précédente, joue un rôle très important dans les

étapes précoces du cycle. Elle est également un déterminant majeur de l'import nucléaire permettant l'infection de cellules ne se répliquant pas. Ainsi, si on construit un virus chimère MLV-HIV possédant la capsid de MLV, l'infection de cellules ne se divisant pas n'est plus possible [Yamashita and Emerman, 2004]. La capsid, en interagissant avec la protéine Nup358 (aussi appelée RANBP2), amarre le virion du côté cytoplasmique du pore nucléaire [Lee et al., 2010], ce qui appuie l'hypothèse que CA reste associée au PIC jusqu'à l'entrée dans le noyau.

Trois screening de siRNA ont permis de déterminer plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'import nucléaire [Brass et al., 2008], [Konig et al., 2008], [Bushman et al., 2009] : Nup358, TNPO3 (transportin 3) et Nup153. Lorsqu'on fait un knock-down de ces facteurs, l'infection est bloquée après la transcription inverse et avant l'intégration.

Un des modèles proposés pour l'import nucléaire est présenté sur la figure 1.14. Tandis que la décapsidation s'amorce rapidement après l'entrée dans la cellule, la protéine CA qui reste associée au RTC s'associe au NPC (complexe de pore nucléaire) via Nup358 côté cytoplasme [Di Nunzio et al., 2012]. Ensuite, CPSF6 et Nup153 permettent la conversion du RTC en PIC et son passage côté noyau [Woodward et al., 2009]. La capsid a été retrouvée dans le noyau de macrophages primaires, montrant qu'elle reste probablement associée longtemps au PIC et qu'elle participe à l'entrée du virus dans le noyau de cellules différenciées [Peng et al., 2014]. Le rôle de TNPO3 est plus difficile à cerner. Ainsi, des études ont montré que la fonction cellulaire principale de TNPO3 est probablement le contrôle de la localisation de CPSF6. Lorsque TNPO3 est absent, CPSF6, normalement plutôt nucléaire, se relocalise dans le cytoplasme et ceci est associé à une baisse de l'infectivité [Lee et al., 2010], [De Iaco et al., 2013]. Une explication de cette baisse d'infectivité est une stabilisation accrue du core viral après interaction entre CA et CPSF6, qui empêche la décapsidation. Par un crible double-hybride en levure, il a été prouvé que TNPO3 (TRN-SR2) interagit avec l'intégrase et qu'elle joue un rôle clé dans l'import du PIC [Christ et al., 2008]. Une fois que le PIC a été importé dans le noyau, la prochaine étape du cycle est l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de l'hôte. Une étude de 2016 a montré que l'association du PIC avec CPSF6 était importante pour le choix du site d'intégration [Sowd et al., 2016]. Ces observations permettent d'entrevoir la complexité et l'imbrication des différentes étapes entre elles : ainsi, la transition d'une étape du cycle à l'autre n'est pas franche, on assiste plutôt à un glissement continu d'une étape à l'autre.

e) Intégration

L'intégrase catalyse 2 réactions enzymatiques essentielles : le clivage des extrémités 3' de l'ADN viral et les réactions de transfert de brins. L'activité de l'intégrase commence dès la synthèse de l'ADN viral double brin. Dans le PIC, l'intégrase se multimérise sur l'ADN pour former un complexe intégrase-ADN viral connu sous le nom d'intasome [Hare et al., 2010], [Maertens et al., 2010]. La co-

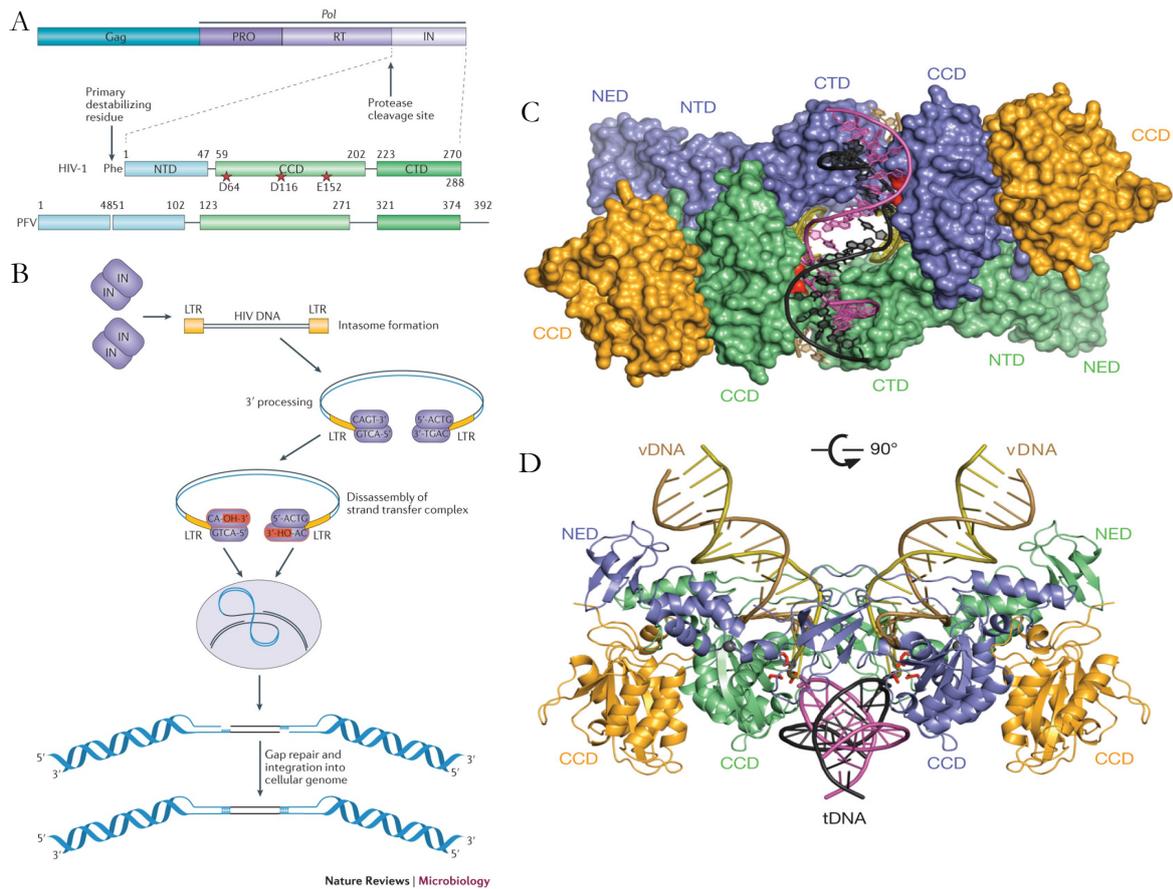


FIGURE 1.15 – A. Organisation de l'intégrase du VIH-1 en domaines et comparaison avec l'intégrase de PFV (Prototype Foamy Virus). B. Mécanisme d'intégration du VIH-1 [Lusic and Siliciano, 2017]. C et D. Représentations de la structure de l'intégrase de PFV co-cristallisée avec l'ADN viral et l'ADN accepteur [Maertens et al., 2010].

cristallisation de l'intégrase du VIH avec ses ADN viral et cible n'a encore jamais été observée et les informations viennent de l'intégrase du PFV (Prototype Foamy Virus, cf figure 1.15A.). La structure cristallographique de l'intasome de PFV montre qu'il comporte un tétramère (ou dimère de dimères) d'intégrase et que l'activité dépend de la tétramérisation [Krishnan et al., 2010]. Une sous-unité de chaque dimère d'intégrase se lie à l'ADN viral pour le clivage des extrémités 3' : l'intégrase clive 2 nucléotides à l'extrémité 3' de l'ADN viral à bouts francs, générant des extrémités 3' OH réactives (cf figure 1.15 B.).

Une fois dans le noyau, l'intasome s'associe à l'ADN cible et la réaction de transfert de brin a lieu : les 3' OH libérés à l'étape précédente vont pouvoir chacun faire une addition nucléophile catalysée par l'intégrase sur chacun des brins complémentaires de l'ADN cible. Comme on peut le voir sur la figure 1.15 C. et D., l'intégration se fait au niveau d'un grand sillon élargi par l'association à l'intégrase.

On obtient donc un intermédiaire où les extrémités 3' de l'ADN viral sont chacune liée à un 5' phosphate de l'ADN cible. Cela a pour effet de générer des régions simples brins de chaque côté du provirus intégré, puisque les deux sites d'attaque sur les brins complémentaires sont séparés de 5 paires de bases dans le cas du VIH-1. La machinerie de réparation de l'ADN va intervenir. Elle clive les 2 nucléotides non appariés côté 5' du provirus, complète l'ADN cellulaire par complémentarité avec le brin intact et ligue le 5' phosphate du virus avec le 3' OH de l'hôte. On obtiendra les mêmes 5 nucléotides répétés de chaque côté du provirus [Vink et al., 1990].

L'intégration ne se produit pas à un endroit aléatoire dans le génome de l'hôte mais préférentiellement dans les régions activement transcrites [Schroder et al., 2002] et il existe plusieurs protéines cellulaires qui orientent le ciblage du site d'intégration. LEDGF/p75 (Lens epithelium derived growth factor) est capable d'interagir avec l'intégrase et avec la chromatine [Cherepanov et al., 2003], [Llano et al., 2006] et sa présence est requise pour permettre au PIC de s'associer à la chromatine dans des régions où les gènes sont hautement épissés [Singh et al., 2015]. CPSF6 possède également un rôle essentiel pour le choix du site d'intégration [Sowd et al., 2016], puisqu'elle est capable de cibler préférentiellement le PIC vers les régions de chromatine ouverte.

Une grande partie de l'ADN viral ne parvient pas jusqu'à l'intégration complète dans le génome de l'hôte, laissant de nombreuses formes d'ADN viral non intégré (uDNA pour Unintegrated Viral DNA). Celui-ci peut être présent sous de nombreuses formes (cf figure 1.16) :

- produits d'autointégration
- cercle à 1 LTR issu de la recombinaison homologue entre les LTR (jusqu'à 20-30% du génome viral)
- cercle à 2 LTR issu de la circularisation d'un ADN viral linéaire par le système de réparation de l'ADN NHEJ (Non Homologous End Joining). Cette forme est caractéristique de l'import nucléaire puisque le système NHEJ n'est présent que dans le noyau (2 à 5 % du génome viral)

La fin de l'intégration marque la fin des étapes précoces de l'infection. Le génome viral étant intégré au génome cellulaire, il sera répliqué en même temps que l'ADN cellulaire et les protéines virales pourront être transcrites et traduites par la machinerie cellulaire, à l'instar des gènes de l'hôte. Cette expression des protéines virales marque le début des phases tardives.

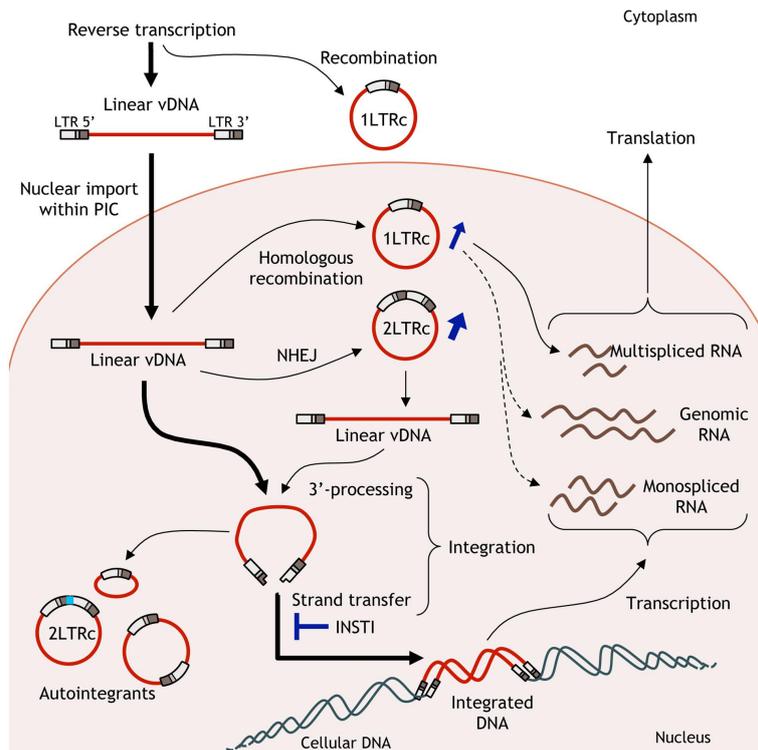


FIGURE 1.16 – Devenir de l'ADN non intégré dans le noyau de la cellule cible [Thierry et al., 2017]

A.2. Phases tardives

a) Transcription des ARN viraux

La régulation de l'expression des gènes proviraux du VIH-1 est finement régulée par la liaison de protéines cellulaires et virales à un certain nombre de séquences régulatrices en cis situées dans le LTR du génome viral (cf figure 1.17). La séquence de transactivation TAR (Transactivation Responsive Region) est située dans le domaine R (nt +1 à +60). Le promoteur majeur (nt -78 à -1) est précédé d'une séquence "enhancer" (nt -105 à -79) et d'une région modulatrice (nt -454 à -104) [Pereira et al., 2000].

Le promoteur majeur contient 3 séquences permettant une initiation efficace de la transcription : le site de liaison à Sp1, une séquence TATA et une séquence activatrice très active reconnue par NF- κ B [Jones et al., 1986], [Garcia et al., 1989], [Mallardo et al., 1996].

L'initiation de la transcription est très efficace, mais le complexe Pol II ne parvient pas à continuer l'élongation de l'ARNm viral et la courte séquence obtenue ne permet pas la réplication du virus. Pour surmonter cette restriction, le VIH encode une protéine virale Tat, capable de transactiver l'expression des gènes viraux [Kao et al., 1987]. Le complexe Pol II est capable de synthétiser un petit fragment d'ARN, la séquence TAR qui s'organise en structure tige-boucle à l'extrémité 5' des transcrits. Cette structure est reconnue par Tat, qui recrute à son tour les protéines CDK9 et CycT1 du complexe

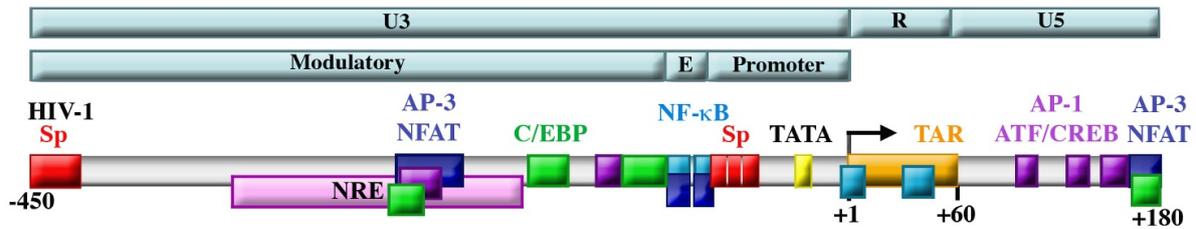


FIGURE 1.17 – Structure du LTR du VIH-1 avec les différentes séquences régulatrices de la transcription [Kilareski et al., 2009]. Le promoteur contient une TATA box (jaune), un site de liaison à Sp (rouge) et des enhancers (bleu). La région R contient une séquence TAR (orange) qui forme une structure ARN tige-boucle après transcription et qui se lie à la protéine virale Tat.

TEFb [Dingwall et al., 1989], [Kim et al., 2002], [Wei et al., 1998]. Ces protéines phosphorylent NELF (Negative Elongation Factor) et DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor) qui étaient responsables de la pause de la polymérase, ainsi que la queue C terminale de l'ARN polymérase II, ce qui permet une reprise de la transcription [Peterlin and Price, 2006]. De par sa capacité à générer une association à un certain nombre de facteurs activant la transcription, le LTR du VIH-1 est un promoteur extrêmement efficace capable de supporter des niveaux de transcription bien supérieurs au promoteur immédiat précoce du CMV (Cytomégalovirus).

La protéine virale Tat peut également contribuer à la réactivation du provirus lorsque celui-ci se trouve en phase de latence. Il a été montré, dans des lymphocytes T CD4 mémoire qu'une réactivation du virus par Tat était indépendante d'une activation cellulaire [Lin et al., 2003]. Un site de fixation à NF- κ B est également présent dans le promoteur viral et les modulations de l'activité de cette protéine permettent tour à tour d'activer ou d'inactiver la transcription du VIH, jouant un rôle dans la réactivation du virus et la latence (pour revue, cf [Siliciano and Greene, 2011]).

La transcription du génome viral est à l'origine de près de 70 transcrits viraux, qui possèdent au moins 4 sites donneurs et huit sites accepteurs d'épissage (cf figure 1.18). Dans chaque ARNm épissé, le premier site donneur ou 5'ss (pour 5' splicing site appelé site majeur d'épissage) est associé à un des sites accepteurs. Ainsi, tous ARNm du VIH-1 contiennent le même exon non-codant hautement structuré, qui va de la coiffe 5' au premier site majeur d'épissage. Les protéines Tat, Rev et Nef sont traduites à partir d'ARNm complètement épissés. Vif, Vpr, Vpu et Env sont obtenus à partir d'ARNm épissés une fois, qui conservent un intron fonctionnel. L'ARN non épissé est l'ARN génomique qui sera encapsidé dans les virions et c'est aussi lui qui va donner Gag et Pol.

Les ARNm viraux totalement épissés suivent la même voie que les ARNm cellulaires : il sont coiffés, épissés et polyadénylés, puis exportés hors du noyau par la voie NXF1. À la différence des ARNm cellulaires contenant toujours un intron qui sont retenus dans le noyau, les ARNm viraux possédant

HIV-1 relies on alternative splicing and intron retention for gene expression.

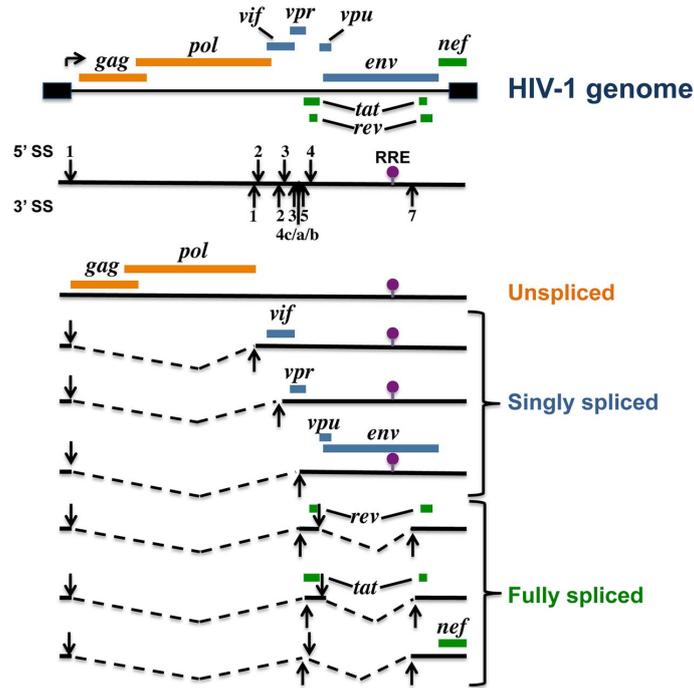


FIGURE 1.18 – Différents sites d'épissage et ARN épissés du VIH-1 [Mahiet and Swanson, 2016]. L'ARNm immature possède 4 sites donneurs et 8 sites accepteurs d'épissage, permettant de synthétiser

un intron sont exportés dans le cytoplasme grâce à la protéine virale Rev (voir ref [Karn and Stoltzfus, 2012] pour revue). Rev possède une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal) capable d'interagir avec une séquence ARN hautement structurée dans le gène *env* appelée Rev-responsive element (RRE) [Malim et al., 1989]. La région RRE est une structure tige-boucle de 351 nucléotides. Après liaison d'une première protéine Rev au site RRE, d'autres monomères s'additionnent au complexe. Le degré d'oligomérisation corrèle avec la capacité de Rev à exporter l'ARN [Mann et al., 1994]. De plus, l'oligomérisation de Rev sur le RRE a un effet coopératif sur la protéine et résulte en une affinité 500 fois supérieure à la liaison d'une seule protéine de Rev pour le site d'interaction [Daugherty et al., 2008].

Le transport de l'ARN du VIH hors du noyau se fait à travers les complexes du pore nucléaire (NPC). En effet, lorsque Rev est lié au RRE, le NLS est masqué par l'interaction avec l'ARN. Le complexe Rev-ARN se lie à Crm1 (aussi appelé exportine 1) via une séquence NES (Nuclear Export Signal). [Fischer et al., 1995], puis il est exporté du noyau. Après export de l'ARN, le complexe est déstabilisé, l'ARN est libéré dans le cytoplasme de Rev rentre à nouveau dans le noyau en s'associant à l'importine β [Henderson and Percipalle, 1997].

La capacité de Rev à naviguer entre le noyau et le cytoplasme permet l'export d'ARN viraux plus

ou moins épissés. Ainsi, les premiers ARN transcrits sont totalement épissés et permettent entre autre l'obtention de Rev. Avec l'augmentation de la quantité de Rev dans la cellule, les ARN exportés sont de moins en moins épissés, permettant l'export de l'ARN génomique non épissé.

Les nombreux ARNm viraux ne permettent pas la synthèse de toutes les protéines virales et c'est en modulant la traduction que le virus va parvenir à toutes les obtenir.

b) Traduction des protéines virales

L'initiation de la traduction des ARNm eucaryotes implique un balayage depuis la coiffe en 5' jusqu'à la reconnaissance du premier AUG dans une séquence Kozak adéquate. Le premier exon du VIH-1 contient des séquences hautement structurées (séquence TAR, site de liaison au primer, épingle poly-A et séquences d'encapsidation), ce qui exclut un mécanisme de balayage classique [Parkin et al., 1988], [Miele et al., 1996]. De plus, les UTR des ARNm du VIH-1 contiennent le codon AUG en amont de l'authentique codon initiateur. Enfin, les ARNm codant pour Env sont bicistroniques et possèdent deux cadres ouverts de lecture superposés [Karn and Stoltzfus, 2012].

Il est donc nécessaire pour le virus de surmonter tous ces obstacles pour effectuer une traduction efficace et plusieurs mécanismes ont été proposés. Tout d'abord, il a été proposé que le VIH-1 possède un IRES (Site interne d'entrée du ribosome), similaire à celui trouvé chez les picornavirus, qui permettrait la reconnaissance directe du codon initiateur de Gag sans balayage par le ribosome [Brasey et al., 2003]. La transcription cap-indépendante au niveau d'un IRES est une des possibilités pour le virus de s'affranchir des problèmes de balayage du ribosome et il existe également la présence d'un élément de contrôle post-transcriptionnel (PCE pour Post-transcriptional Control Element). La séquence PCE est une structure tige-boucle de l'ARN à laquelle s'associe spécifiquement l'hélicase cellulaire RHA (RNA helicase A). La présence de cette hélicase est essentielle pour une traduction efficace d'ARNm contenant des PCE [Hartman et al., 2006]. D'autres protéines cellulaires sont également impliquées dans la modulation de la transcription virale, comme l'hélicase DDX3 ou la navette nucléocytoplasmique Sam68 qui activent la transcription [Soto-Rifo et al., 2012], [Modem et al., 2005] ou la protéine nucléaire hnRNP E1 qui diminue la production de Gag, Env et Rev [Woolaway et al., 2007] (pour revue [Ohlmann et al., 2014]).

Une fois le ribosome associé à l'ARNm viral, l'initiation de la traduction ne se produit pas toujours au niveau du même AUG. C'est un mécanisme dit de "leaky scanning" où le ribosome parcourt l'ARNm et ne s'arrête pas toujours au premier AUG rencontré. Dans le cas du VIH-1, ce mécanisme est observé pour la traduction de l'ARN bicistronique *vpu-env*. Le cadre ouvert de lecture (ORF) de Vpu précède celui de Env. Schwartz et al. ont montré que la protéine Env était synthétisée par un mécanisme de "leaky scanning" au cours duquel le complexe de pré-initiation 43S passe sur l'AUG de Vpu sans s'y arrêter, car celui-ci est dans un contexte Kozak faible [Schwartz et al., 1990], [Schwartz et al., 1992].

L'ARNm non épissé du VIH-1, qui permet de coder pour les polyprotéines Gag et Gag-Pol peut subir une initiation de la traduction cap-dépendante, ou utiliser un site interne d'entrée du ribosome [Brasey et al., 2003]. Un décalage de -1 dans le cadre de lecture (ou frameshifting) est nécessaire pour passer de Gag à Pol. Ce décalage se produit dans environ 5% des cas et conduit à la production d'une protéine Gag-Pol pour 20 Gag synthétisés. Deux séquences sont essentielles pour qu'il puisse se produire : une séquence "glissante" de 7 nucléotides UUUUUUA et un pseudo-noeud situé en 3' de cette séquence de 7 nucléotides [Staple and Butcher, 2005]. Le complexe ribosomal est arrêté au niveau du pseudo-noeud, ce qui augmente son temps de contact avec la séquence glissante et permet ainsi le décalage du cadre de lecture de -1.

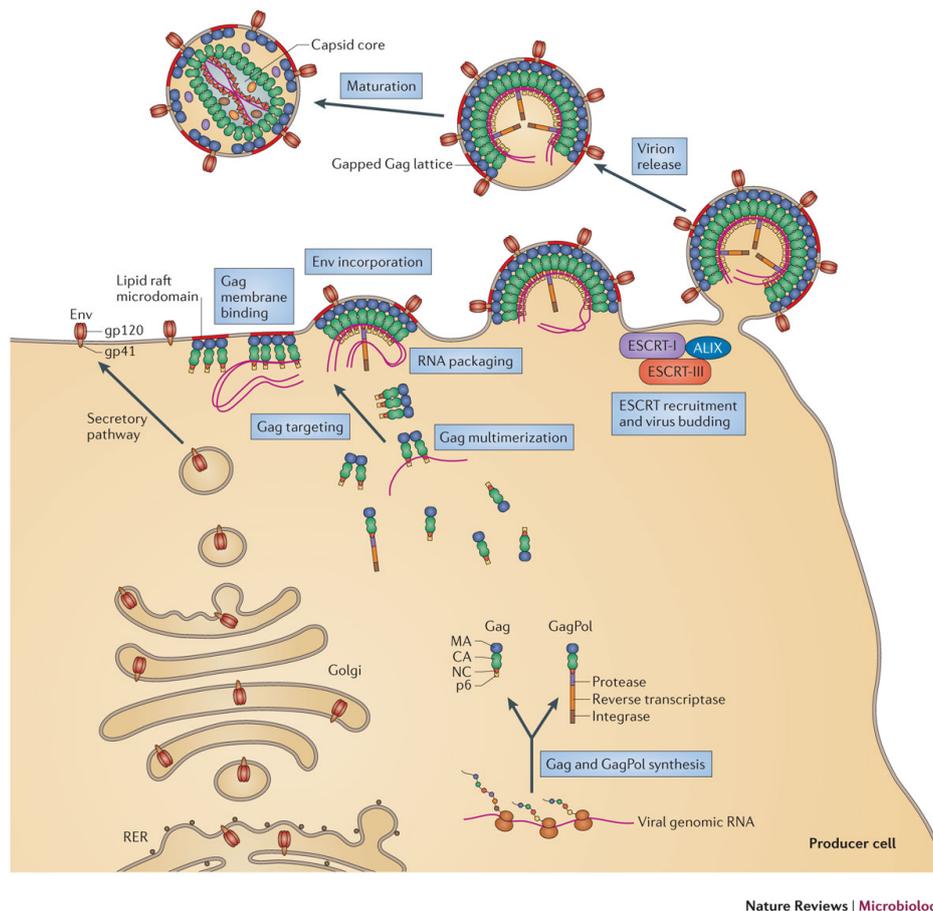
Au cours du cycle de réplication du VIH-1, les protéines virales inhibent différents facteurs de transcription cellulaire. La protéase, en plus de son rôle dans la maturation du virus, est capable de dégrader eIF4G et PABP, inhibant ainsi la traduction cellulaire [Ventoso et al., 2001], [Castelló et al., 2009]. La séquence TAR de l'ARN viral est capable d'activer PKR (Protein Kinase RNA-activated), ce qui va également conduire à une inhibition de la traduction des protéines de l'hôte (pour revue, voir [Clerzius et al., 2011]).

En détournant la machinerie de traduction de l'hôte à son avantage, ces mécanismes permettent au virus de produire de nombreuses protéines virales, qui vont pouvoir s'associer pour former de nouveaux virions.

c) Assemblage, bourgeonnement et maturation des particules virales

La polyprotéine Gag est essentielle pour la formation de nouvelles particules virales (elle compose plus de 50% de la masse du virion [Sundquist and Krausslich, 2012]) et chaque sous-domaine y participe : MA adresse Gag à la membrane plasmique et aide à l'incorporation d'Env, CA est le moteur de la multimérisation qui a lieu lors de l'assemblage, NC recrute l'ARN viral dans les virions et participe à l'assemblage et p6 recrute le complexe cellulaire ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (cf figure 1.19).

Après sa synthèse dans le cytoplasme, Gag forme des monomères ou dimères qui sont adressés à la membrane plasmique [Kutluay and Bieniasz, 2010], où le domaine MA chargé positivement interagit avec un lipide très présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique, le PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) [Ono and Freed, 2004], [Ono et al., 2004], [Saad et al., 2006]. Des études RMN ont permis de montrer que la liaison entre PI(4,5)P₂ et MA entraîne l'exposition d'un motif myristate lié à l'extrémité N-terminale de MA, ce qui stabilise l'interaction MA-membrane en s'insérant dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Gag entraîne le recrutement de microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides qu'on appelle rafts lipidiques [Hogue et al., 2011]. L'importance d'adresser Gag au niveau des rafts lipidiques est reflétée par la composition



Nature Reviews | Microbiology

FIGURE 1.19 – Phases tardives du cycle du VIH-1 : assemblage, bourgeonnement et maturation [Freed, 2015]. Env passe par la voie sécrétoire tandis que Gag est synthétisée dans le cytoplasme. Gag multimérise, recrute l'ARN génomique puis atteint la membrane plasmique. La particule en cours d'assemblage recrute Env et le complexe ESCRT. Après bourgeonnement de la particule virale, le clivage de Gag et GagPol par la protéase virale constitue l'étape de maturation.

de l'enveloppe virale, riche en cholestérol, sphingolipides et PI(4,5)P₂ [Brugger et al., 2006]. Les zones de contact cellule-cellule qu'on appelle "synapses virologiques" sont également riches en rafts lipidiques et le fait que Gag s'associe préférentiellement à ces microdomaines membranaires peut favoriser l'assemblage au niveau des synapses virologiques, augmentant ainsi le transfert viral [Jolly and Sattentau, 2005].

Dans le VIH-1, deux copies d'ARN viral sont incorporées dans les virions. L'ARN dimérisé est reconnu au niveau de sa séquence d'encapsidation Ψ par le domaine NC de Gag [Nikolaitchik et al., 2013]. NC contient deux domaines à doigts de zinc (Cys-Cys-His-Cys) entourés de résidus basiques qui augmentent son affinité pour l'ARN. Il semblerait que Gag et l'ARN interagissent dans le cytoplasme, puis Gag permet le recrutement de l'ARN à la membrane plasmique où il va amorcer l'assemblage de la particule [Kutluay and Bieniasz, 2010].

Le domaine CA est le principal acteur de la multimérisation de Gag et plus particulièrement son

extrémité C terminale [Gamble et al., 1997]. Dans les particules virales immatures, les molécules de Gag (environ 2500 par virion) sont arrangées en hexamères creux et orientées radialement [Briggs et al., 2009] et elles intègrent des petits défauts (arrangements non hexamériques) qui permettent à la structure entière de se courber en une structure sphérique [Briggs et al., 2009]. Cette sphère en formation contient un espace correspondant à un tiers de la surface membranaire, qui correspond à la zone de bourgeonnement [Carlson et al., 2010].

La glycoprotéine Env passe par le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion cellulaire où elle gagne ses motifs glycosylés. Après clivage par la protéase cellulaire furine dans le Golgi en gp41 et gp120, elle est également retrouvée au niveau de la membrane plasmique et sa longue queue cytoplasmique participe à l'incorporation via une interaction avec Gag [Tedbury and Freed, 2014]. Plusieurs mécanismes non-exclusifs ont été proposés : un procédé passif, un adressage commun de Gag et Env à un même domaine de la membrane plasmique (les rafts lipidiques par exemple), le recrutement de Env par Gag directement ou indirectement via une protéine cellulaire intermédiaire [Checkley et al., 2011].

Après assemblage du réseau de Gag sous la membrane plasmique, la particule naissante doit subir une étape de fission des membranes pour se détacher de la surface cellulaire. Cette étape de bourgeonnement est possible grâce à la machinerie ESCRT qui est détournée par Gag [Usami et al., 2009], [Hurley and Hanson, 2010]. Les protéines ESCRT catalysent également les réactions de fission de membranes qui conduisent à la libération de vésicules dans les MVB (MultiVesicular Bodies) [Hurley and Hanson, 2010] et la séparation des deux cellules-filles lors de la division cellulaire [Carlton and Martin-Serrano, 2007]. Dans le cas du VIH-1, le domaine P6 de Gag contient 2 motifs (dits domaines tardifs) responsables du recrutement des facteurs ESCRT : PTAP (Pro-Thr-Ala-Pro) qui se lie à la sous-unité TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101) du complexe hétérotétramérique ESCRT-I et un domaine LYPX_nL (Leu-Tyr-Pro-Xaa_n-Leu) qui recrute Alix, un partenaire du complexe ESCRT-III [Martin-Serrano et al., 2001], [Usami et al., 2009]. Une fois TSG101/ESCRT-I et Alix associés à Gag, ils recrutent à leur tour les complexes ESCRT-III et VPS4, capables de générer la fission des membranes et le recyclage des facteurs ESCRT [Hurley and Hanson, 2010].

Au niveau protéique, un changement de conformation d'Alix après liaison à Gag permet l'association à CHMP4 (CHarged Multivesicular body Proteins, membre d'ESCRT-III) [Usami et al., 2009]. Cela induit une polymérisation en filaments de CHMP4 sous le virus en bourgeonnement, ainsi que l'association avec CHMP2 [Morita et al., 2011]. Cette dernière protéine peut alors s'associer à la famille d'ATPases VPS4 qui fournissent l'énergie nécessaire au resserrement de la membrane plasmique (par enroulement des filaments de CHMP2 et CHMP4 en spirale), jusqu'à obtenir la fission [Hurley and Hanson, 2010].

Pendant, ou peu de temps après le bourgeonnement de la particule, la protéase virale clive les polyprotéines Gag et GagPol afin de déclencher la maturation du VIH-1. La protéase fonctionne en

tant que dimère, avec son site actif situé dans une crevasse à l'interface [Wlodawer and Erickson, 1993]. Après clivage, à dix sites différents, on obtient les protéines virales MA, CA, NC, p6, PR, RT et IN [Sundquist and Krausslich, 2012]. Au cours de cette étape, la particule virale se réarrange afin de former le core conique constitué de 1200 copies de CA. MA reste associée au feuillet interne de la membrane plasmique et la nucléocapside associée à l'ARN est enfermée dans le core de CA [Briggs et al., 2006].

La particule virale nouvellement synthétisée possède ainsi tous les éléments nécessaires à l'infection d'une nouvelle cellule-cible.

B. Réponse immunitaire innée et interféron

B.1. Différence de susceptibilité des cellules immunitaires à l'infection par le VIH-1

Les cellules cibles du VIH sont des cellules du système immunitaire : lymphocytes T CD4, mais aussi cellules myéloïdes (cellules dendritiques, monocytes et macrophages). Les souches de virus T-tropiques utilisent le co-récepteur CXCR4 et infectent les lymphocytes T CD4, tandis que les souches M-tropiques se lient au co-récepteur CCR5 et infectent les cellules myéloïdes et les lymphocytes T mémoire. Bien que le virus possède la capacité de rentrer dans ces différentes cellules, elles ne sont pas toutes aussi permissives à l'infection (cf table 1.4).

Type cellulaire	Niveau d'infection par le VIH	Étape(s) du cycle viral bloquée(s)
Lymphocytes T CD4	Non permissif (-) en état de quiescence Permissifs après activation (+++)	Transcription inverse, import nucléaire, intégration et étapes post-intégration
Monocytes	Non permissifs	Transcription inverse, étapes post RT avant l'intégration import nucléaire et transcription
Macrophages	Permissifs (+)	Transcription inverse
Cellules dendritiques myéloïdes	Peu permissives (+/-)	Transcription inverse
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	Non permissives	Mal caractérisé

TABLE 1.4 – Susceptibilité des cellules-cibles à l'infection par le VIH

Dans le cas des lymphocytes T CD4, la permissivité de l'infection par le VIH-1 dépend de l'état d'activation des cellules : les LT CD4 activés sont très susceptibles à l'infection et permettent une réplication efficace du virus tandis que les LT CD4 latents sont très peu permissifs même s'ils peuvent être infectés *in vivo* et servir de réservoir viral [Zack et al., 1990]. Le virus entre dans les lymphocytes

latents, mais ne parvient pas à faire correctement sa transcription inverse, ni à s'intégrer dans le génome de la cellule-cible [Stevenson et al., 1990]. Cela peut s'expliquer par plusieurs aspects : des facteurs de transcription de l'hôte (NF- κ B et NFAT par exemple) utilisés par le virus sont séquestrés dans le cytoplasme des lymphocytes latents ; la quantité de dNTP est faible à cause du facteur de restriction SAMHD1 (cf partie C.3.) [Nabel and Baltimore, 1987], [Stevenson et al., 1990], [Descours et al., 2012].

Les lymphocytes T CD4 activés sont très permissifs à l'infection par le virus, mais la majorité d'entre eux meurt rapidement à cause des effets cytopathiques du virus. Une faible proportion des lymphocytes activés peut retourner à un état de quiescence et s'ils ont été infectés, servir de réservoir viral. Ainsi, si le virus a eu le temps de finir sa transcription inverse et de s'intégrer dans le génome du lymphocyte lorsque celui-ci devient quiescent, le génome viral reste présent dans le noyau du lymphocyte latent. Même si aucune protéine virale n'est détectée pendant les phases de latence, dès que le lymphocyte sera réactivé par une stimulation antigénique, l'expression des protéines virales reprendra [Chun et al., 1995], [Siliciano and Greene, 2011].

Les monocytes sont, à l'instar des lymphocytes quiescents, très réfractaires à l'infection par le VIH-1. Les monocytes possèdent peu de récepteurs et corécepteurs d'entrée à leur surface, mais le blocage de l'infection persiste si on pseudotype le virus avec l'enveloppe du VSV. Le virus est donc bloqué après l'entrée, mais avant la transcription inverse et l'intégration [Sonza et al., 1996], [Neil et al., 2001], [Triques and Stevenson, 2004]. Malgré ces blocages observés *in vitro*, *in vivo*, des monocytes infectés ont été récoltés dans le sang périphérique de patients sous thérapie antirétrovirale [Crowe and Sonza, 2000]. Une étude réalisée en 2008 au laboratoire a montré que cela s'explique par la très lente cinétique de RT et d'intégration ($t_{1/2} = 7-8$ jours) dans les monocytes [Arfi et al., 2008]. Une restriction transcriptionnelle a également été proposée pour expliquer la résistance des monocytes à l'infection par le VIH-1 [Kilareski et al., 2009].

Les monocytes ne circulent dans le sang que quelques jours avant leur extravasation vers les tissus où ils se différencient en macrophages et cellules dendritiques.

Les macrophages représentent 10% des cellules infectées d'un patient infecté par le VIH-1 et jouent également un rôle de réservoir viral [Zhang et al., 1999], [Gorry et al., 2014]. Cependant, l'infection des macrophages est limitée par la faible expression membranaire du récepteur CD4 [Lee et al., 1999]. Une étude de l'équipe du professeur Sattentau [Baxter et al., 2014] a proposé que l'infection des macrophages soit augmentée par la capture de lymphocytes T CD4 infectés. Cela favorise l'entrée du virus dans les cellules, mais leur permissivité reste faible notamment à cause de l'étape de RT qui est très lente. La présence du facteur de restriction SAMHD1 explique cette cinétique défavorable au virus [Lahouassa et al., 2012]. L'induction d'un état ressemblant à G1 dans 20% des macrophages tissulaires (mais sans synthèse d'ADN ni division) favorise l'infection par le VIH-1 en inactivant SAMHD1 [Mlcochova et al., 2017] et permettrait d'expliquer la capacité du VIH à se répliquer dans les macrophages.

Les cellules dendritiques du sang sont composées de deux sous-populations majoritaires : les mDC (cellules dendritiques myéloïdes) et les pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes) et représentent 0,5 à 2 % des cellules mononucléaires du sang. Bien qu'elles soient infectées *in vivo*, les cellules dendritiques sont beaucoup plus restrictives à l'infection par le VIH que les lymphocytes T CD4 [Donaghy et al., 2001], [McIlroy et al., 1995]. Comme pour ce qui observé pour les monocytes et les macrophages, l'étape de transcription inverse est limitante dans ces cellules [Goujon et al., 2007]. La différence de susceptibilité entre pDC et mDC est débattue : certains proposent que le virus se réplique plus activement dans les pDC [Patterson et al., 2001] tandis que d'autres montrent que les pDC sont moins susceptibles que les mDC [Smed-Sørensen et al., 2005].

Étant donnée la faible quantité de cellules dendritiques dans le sang périphérique, la plupart des études *in vitro* utilisent des MDDC (Monocyte-Derived Dendritic Cell), dont le comportement est le même que celui des mDC.

Bien que le VIH n'infecte pas efficacement les DC en elles-mêmes, il exploite leurs propriétés de cellules présentatrices d'antigènes pour se disséminer. Les pDC arrivent très rapidement sur le lieu de l'infection et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chemokines pour attirer les cellules T, favorisant ainsi le recrutement de la cible de prédilection du VIH-1 [McKenna et al., 2005], [Espíndola et al., 2016]. Cependant, les pDC sont également capables de produire de grandes quantités d'interféron- α dont le rôle est central dans les défenses immunitaires de l'hôte [Chelbi-Alix and Wietzerbin, 2007] (cf partie b)).

B.2. Réponse interféron à l'infection par le VIH-1

a) Détection du VIH-1 par les senseurs de l'immunité innée

La réponse immunitaire innée lors de l'infection par un virus commence lorsque le pathogène est repéré par la cellule via des senseurs de l'immunité innée, les PRR (Pathogen Recognition Receptor). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des motifs associés aux pathogènes, appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui peuvent être des motifs glucidiques absents chez l'hôte (LPS), des protéines spécifiques de pathogènes (flagelline) ou des éléments mal localisés (ADN dans le cytoplasme, ARN dans les endosomes). Les PRR déclenchent une cascade de signalisation qui conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines pour recruter et activer les cellules de l'immunité innée : cellules NK, cellules dendritiques et macrophages (pour revue, voir [Doyle et al., 2015], [Altfeld and Gale Jr, 2015]). Cela entraîne la mise en place d'une première défense rapide de l'organisme pour contrer la propagation du virus et sert également à activer et moduler la réponse immunitaire adaptative [Iwasaki and Medzhitov, 2010].

Il existe plusieurs types de PRR dont la localisation, le motif reconnu et la voie de signalisation différent : les TLR (Toll-like receptor), les RLR (RIG-I like receptor), les senseurs d'ADN et les NLR

(Nod like receptor) [Kumagai and Akira, 2010]. Les pDCs sont des cellules riches en PRR, soulignant clairement le rôle essentiel qu'elles jouent dans la détection du VIH-1. Cela se traduit par une forte production d'interféron- α par ces cellules spécialisées [Gilliet et al., 2008].

La famille des protéines membranaires TLR comprend 9 membres spécialisés dans la reconnaissance des différents PAMP (fragments de paroi bactérienne, acides nucléiques de bactéries ou de virus, pour revue [Kawai and Akira, 2010]). TRL7, situé dans la membrane des endosomes, est capable de reconnaître de l'ARN génomique viral et notamment celui du VIH-1 [Beignon et al., 2005]. L'activation de TRL7 conduit au recrutement de MYD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) qui peut conduire à deux voies d'activation : l'une passe par IRF7 et va conduire à l'expression des gènes codant pour les interférons tandis que l'autre passe par la famille de kinases IRAK (IL-1 receptor-associated kinases) et NF- κ B pour conduire à la production d'interférons et de cytokines pro-inflammatoires (cf figure 1.20, pour revue [Kawai and Akira, 2010]). TLR7 est exprimé constitutivement dans les pDC et l'infection par le VIH n'est pas nécessaire pour les stimuler : la liaison et l'endocytose suffisent à déclencher la signalisation via le TLR [Beignon et al., 2005].

Une fois que le virus est entré dans le cytoplasme de la cellule, de nouveaux senseurs cytoplasmiques entrent en jeu. La détection cytoplasmique du virus est connue depuis la découverte des interférons [Isaacs and Lindenmann, 1957], mais les mécanismes moléculaires associés n'ont été découverts que récemment. Les récepteurs impliqués sont les RLR qui détectent l'ARN viral et cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), IFI 16 (IFN gamma-inducible protein 16), DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) qui détectent l'ADN viral (pour revue [Paludan and Bowie, 2013]).

Parmi ces senseurs cytoplasmiques, deux d'entre eux sont capables de détecter l'ADN du VIH-1 après infection : cGAS et IFI16 [Gao et al., 2013], [Bode et al., 2016], [Jakobsen et al., 2013]. cGAS le détecte efficacement dans les MDDC ainsi que dans la lignée monocyttaire THP-1. Après liaison à l'ADN viral, cGAS catalyse la synthèse de cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) à partir d'ATP et de GTP. Ce dinucléotide cyclique fonctionne comme un second messenger qui se lie à STING (Stimulator of IFN genes) pour l'activer. STING peut ensuite activer IKK, l'inhibiteur de NF- κ B et ce facteur de transcription va ensuite migrer dans le noyau pour induire la production d'interféron et autres cytokines. STING est également capable de se lier à TBK1 (TANK-binding kinase 1), qui phosphoryle IRF3 et conduit également à la sécrétion d'interférons (cf figure 1.20). Lorsqu'on mute certaines régions de la capsid du VIH (résidus N74D ou P90A), on constate une meilleure détection du VIH par les MDM (monocyte-derived macrophages) [Rasaiyaah et al., 2013].

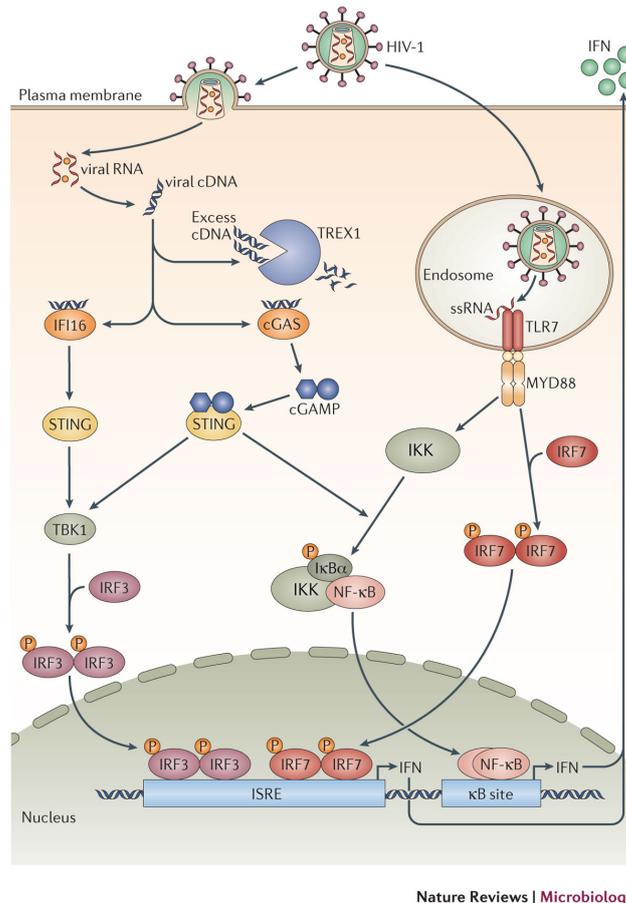


FIGURE 1.20 – **Détection intracellulaire du VIH** [Doyle et al., 2015]. L'ADN rétrotranscrit du virus est détecté par les senseurs cytoplasmiques cGAS et IFI16, qui conduisent à la production d'interférons. L'ARN simple brin du virus peut également être détecté par TLR7, présent à la membrane des endosomes, conduisant aussi à une induction d'interféron.

Ces mutations empêchent l'interaction entre la capsid et les protéines de l'hôte CypA et Nup358, dont le rôle serait de protéger l'ADN viral de la détection.

IFI16 est une protéine contenant un domaine PYD qui permet les interactions avec d'autres protéines possédant le même domaine et un domaine HIN (hematopoietic interferon-inducible nuclear antigen) capable de se lier à l'ADN. De façon similaire à cGAS, IFI16 stimule la production d'IFN par STING et TBK1 (cf figure 1.20). L'activation d'IFI16 induit également l'activation de la caspase 1 et la mort cellulaire par pyroptose [Doitsh et al., 2010]. Une étude publiée en 2017 a montré qu'IFI16 et cGAS coopéraient pour l'activation de STING dans les macrophages et que la présence d'IFI16 était requise pour la production efficace de cGAMP [Jönsson et al., 2017].

En même temps que les senseurs cytosoliques essaient de détecter l'ADN du virus, l'exonucléase cellulaire TREX1 dégrade ce même ADN [Yan et al., 2010]. En le dégradant de cette façon, TREX1 permet l'échappement du virus et diminue l'efficacité de l'activation de l'interféron.

En plus des senseurs spécialisés, des facteurs de restriction (cf partie II.C.) comme TRIM5 α ou

Tétherine participent à la détection du VIH et conduisent via TAK1 (Transforming growth factor- β -activated kinase 1), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 5) et NF- κ B à l'expression de gènes et de cytokines pro-inflammatoires [Galão et al., 2012], [Pertel et al., 2011].

Quel que soit le mode de détection du virus, le système immunitaire est activé et conduit entre autres à la production d'interférons.

b) Familles d'interférons

L'établissement d'un état antiviral est la propriété qui définit les interférons (IFN) et c'est ce qui a permis leur découverte par Isaacs et Lindenmann en 1957 [Isaacs and Lindenmann, 1957]. Ils ont montré qu'un facteur libéré dans le milieu était capable de moduler la réplication virale du virus de la grippe. En 1965, Wheelock décrit une protéine inhibant les virus, sécrétée par des lymphocytes [Wheelock and Sibley, 1965]. Elle s'appelle d'abord IFN immun avant d'être renommée IFN- γ .

La classification des familles de protéines IFN est basée sur leur séquence, leur localisation chromosomique et leur spécificité de récepteur [Pestka et al., 2004]. Il existe trois types d'IFN humain : les IFN de type I, de type II et III (pour revue, voir [Isaacs and Lindenmann, 1957]). Les IFN de type I comprennent l'IFN- α , - β , - ω , - ϵ et - κ . Tous les membres de familles d'IFN de type I et II transmettent des signaux à travers le même récepteur IFNAR (cf partie suivante). La famille d'IFN de type I comporte 13 gènes IFN- α , un gène IFN- β et deux gènes IFN- ω . Comme l'IFN de type I, l'IFN de type III est induit après une infection virale, mais son récepteur diffère et n'est pas exprimé de façon ubiquitaire, suggérant un rôle plus spécifique.

Les IFN de type I α et β sont produits par la plupart des cellules en réponse à l'infection par un pathogène, mais les pDC possèdent la capacité de produire d'importantes quantités d'IFN de type I, principalement α [Takaoka and Yanai, 2006].

L'IFN ainsi produit va ensuite pouvoir stimuler, de façon autocrine ou paracrine, les cellules immunitaires afin de combattre l'infection.

c) Voies de signalisation de l'interféron

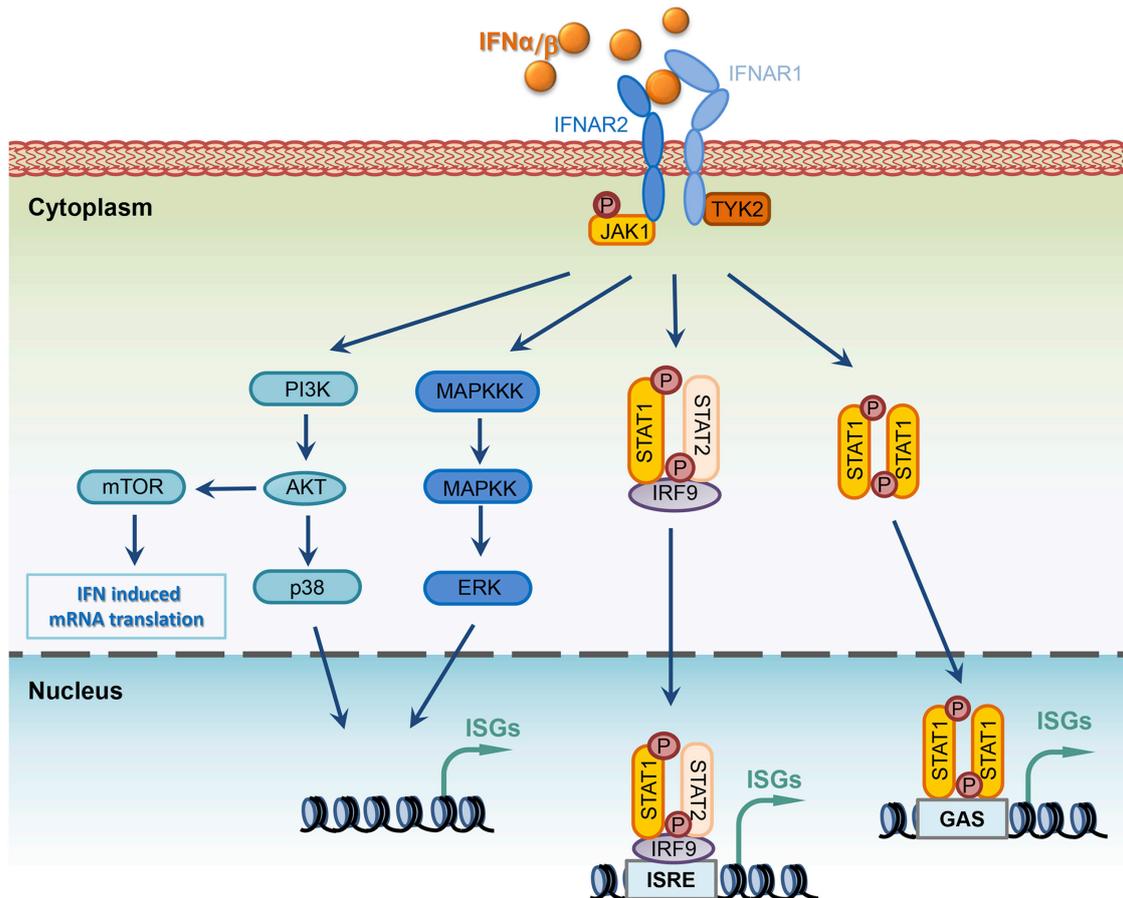


FIGURE 1.21 – Voies de signalisation de l'interféron canonique et non canonique, adapté de [Chen et al., 2017]. La voie canonique passe par les protéines JAK/STAT et conduit à l'activation de deux promoteurs dans le noyau, ISRE et GAS. La voie non-canonique est indépendante de STAT et passe par MAPK, PI3K ou mTOR.

Après détection des produits microbiens par les PRR, de nombreux types cellulaires immunitaires et non-immunitaires produisent et sécrètent des interférons. Les trois types d'interféron déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires, via la voie JAK-STAT (Janus kinase et Signal transducer and activator of transcription), conduisant à des fonctions immunologiques variées.

Les interférons de type I sont reconnus par un récepteur IFNAR hétérodimérique composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 (cf figure 1.21). IFNAR phosphoryle et active les protéines associées

JAK1 et TYK2 (non-receptor tyrosine kinase 2), qui vont à leur tour phosphoryler les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces deux protéines dimérisent et recrutent IRF9 (IFN-regulatory factor 9) pour former un complexe à 3 membres ISGF3. Ce complexe migre dans le noyau où il s'associe à une séquence d'ADN appelée ISRE (IFN-stimulated response element, dont la séquence conservée est TTTCNNTTTC), pour activer la transcription des gènes stimulés par l'interféron (ISG) [Stark and Jr., 2012]. STAT1 peut également s'assembler en homodimère sans IRF9 et s'associer à une autre région du promoteur des ISG, la région GAS (gamma-activated sequence TTCNNNGAA).

D'autres voies non canoniques existent (cf figure 1.21) et passent par la voie des MAPK-ERK (mitogen activated protein kinases et extracellular signal regulated kinase) pour augmenter la transcription des ISG, par PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et par mTOR (mammalian target of rapamycin) une protéine régulatrice de la traduction des ARN [Platanias, 2005].

D'une façon générale, les voies de signalisation IFN permettent de multiples réponses immunes en modifiant des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'activation, l'apoptose... Les protéines encodées par les ISG participent à la protection de la cellule contre les infections, soit en amplifiant la réponse IFN (IRF et PRR qui permettent une meilleure détection du pathogène et activation du système immunitaire), soit en inhibant l'entrée, la réplication, la traduction, l'assemblage et la libération du virus [Schneider et al., 2014] (cf partie II.C.).

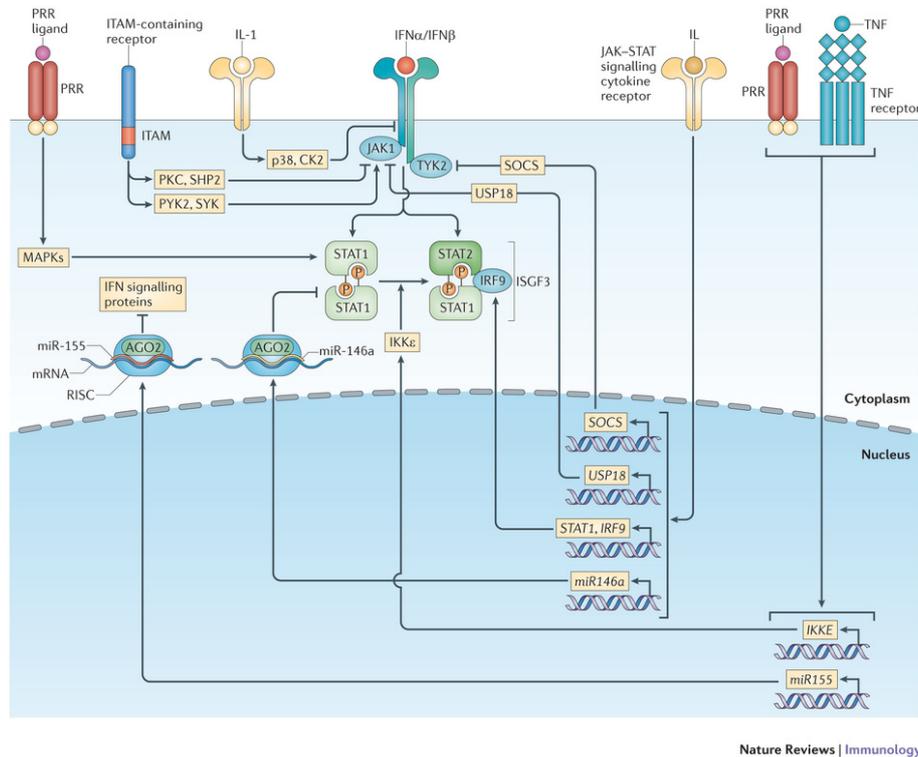
Des modifications épigénétiques des gènes et post-traductionnelles des protéines impliquées permettent une modulation fine de la transduction du signal (modification de leur localisation cellulaire, activité, stabilité, expression). Ainsi, les réponses cellulaires à l'IFN de type I peuvent être modulées selon le type cellulaire, les phases de l'infection ou les stimuli environnementaux [van Boxel-Dezaire et al., 2006].

d) Fin de la réponse interféron

Les dérèglements des réponses interféron sont associés avec de nombreux dysfonctionnements de l'immunité comme les infections chroniques, l'autoimmunité et les maladies inflammatoires. Pour cela, il est nécessaire d'atteindre un équilibre entre immunité protectrice médiée par les IFN et toxicité liée à une signalisation IFN aberrante et donc d'avoir une voie de terminaison de la réponse.

Les mécanismes permettant de supprimer la réponse IFN incluent la diminution de l'expression du récepteur IFNAR en surface, l'induction de régulateurs négatifs comme SOCS (suppressor of cytokine signalling) et USP18 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18) ou de miARN (cf figure 1.22). L'internalisation du récepteur IFNAR est induite après stimulation par IL-1, les TLR ou le stress métabolique ou oxydatif [Bhattacharya et al., 2013], [HuangFu et al., 2012]. SOCS1, SOCS3 et USP18 sont des gènes induits par l'IFN de type I en une boucle rétroactive (negative feedback loop) [Yoshimura et al., 2007], [Sarasin-Filipowicz et al., 2009]. Les protéines SOCS sont en compétition avec STAT pour la liaison à

IFNAR et supprime l'activation de JAK, tandis qu'USP18 déplace JAK1 du récepteur IFNAR2. De plus, les miARN jouent un rôle dans la régulation de la réponse IFN (miR-146a dans les lymphocytes T helper et miR-155 dans les lymphocytes T CD8) [Nazarov et al., 2013].



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 1.22 – **Suppression de la signalisation IFN de type I** adapté de [Ivashkiv and Donlin, 2014]. Les protéines SOCS et USP18 modulent la réponse interféron en empêchant la bonne association d'IFNAR, Jak et STAT. Des miARN (miR-155 et 146a) inhibent la synthèse de protéines impliquées dans la transduction du signal interféron.

C. Gènes de réponse à l'interféron et facteurs de restriction

Chez l'homme, il existe plus de 1000 gènes stimulés par l'interféron, qui codent des protéines participant à la réponse immunitaire. Parmi celles-ci, un certain nombre de protéines cellulaires s'opposent à la réplication virale, par exemple l'entrée de virus (IFITM3), l'intégrité du génome (OAS/RNase L, ADAR1, les membres de la famille APOBEC), la traduction de protéines (PKR, membres de la famille des IFIT) ou la sortie des virus (BST2/Téthérine) [Der et al., 1998], [Schoggins, 2014]. L'activité de ces facteurs de restriction peut être dirigée contre un large spectre de virus, ou être beaucoup plus spécifique d'un pathogène donné. Seuls les effecteurs anti-VIH les mieux caractérisés seront décrits.

C.1. TRIM5 α

En 2004, l'équipe du Dr Sodroski s'intéresse aux barrières d'espèces qui empêchent la transmission inter-espèces de virus de primates. Ils sont partis du constat que le VIH-1 peut entrer dans des cellules de singe (african green mangabey) mais qu'il est bloqué avant l'étape de transcription inverse. Ces travaux ont conduit à la découverte de TRIM5 α comme facteur de restriction du VIH-1 [Stremlau et al., 2004]. TRIM5 α possède un domaine TRIM (tripartite motif), un domaine RING (Really Interesting New Gene) N-terminal qui a une fonction E3 ubiquitine ligase et un domaine PRY-SPRY C-terminal qui permet les interactions protéine-protéine [Uchil et al., 2008].

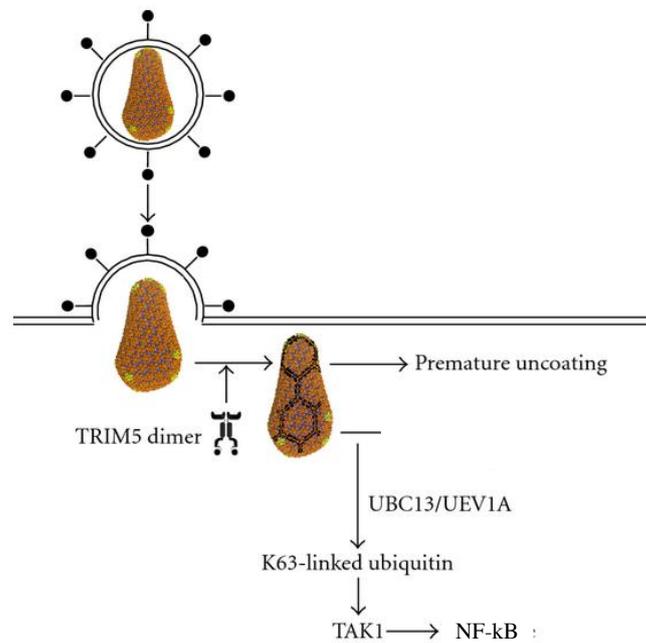


FIGURE 1.23 – **Restriction et signalisation par TRIM5 α** adapté de [Luban, 2012]. TRIM5 α s'associe à la capside et conduit d'une part à une décapsidation prématurée, d'autre part à une cascade de signalisation passant par la voie NF- κ B qui active des gènes de l'immunité innée.

De nombreuses espèces de primates expriment des orthologues de TRIM5 α et les différences de sensibilité des lentivirus de primates aux différents orthologues de la protéine de l'hôte confirment son rôle de barrière d'espèce [Sawyer et al., 2005]. Ainsi, la protéine humaine a une forte activité antivirale contre EIAV et MLV N-tropique, mais inhibe très peu le VIH-1. Les différences de spécificité entre le TRIM5 α humain et celui de macaque sont dues à un petit nombre de résidus dans le domaine PRY-SPRY [Stremlau et al., 2005]. Cela illustre une propriété partagée par la plupart des facteurs de restriction : une interaction directe avec une protéine virale, à l'origine d'un conflit évolutif conduisant aujourd'hui à une forte spécificité virus-hôte (pour revue [Duggal and Emerman, 2012]).

TRIM5 α est capable de s'associer à la capsidе rétrovirale en formant des réseaux hexagonaux à sa surface, ce qui accélère la décapsidation et qui active l'immunité innée [Li et al., 2016], [Stremlau et al., 2006], [Pertel et al., 2011] (cf figure 1.23). Ainsi, 2 molécules de TRIM5 α s'associent à la capsidе et s'assemblent 2 à 2 pour former un réseau hexagonal irrégulier à la surface du core viral, les deux processus étant couplés [Li et al., 2016]. Cet assemblage en réseau irrégulier permet à TRIM5 α de s'adapter à l'irrégularité des cores viraux. L'activité ubiquitineuse de TRIM5 α semble importante pour cette restriction, bien que le mécanisme exact ne soit pas connu. Grâce à sa fonction d'ubiquitination, la protéine est également capable de s'associer au complexe UBC13-UEV1A, afin d'activer la kinase TAK1 et d'induire la voie NF- κ B [Pertel et al., 2011] (cf figure 1.23).

C.2. Téthérine

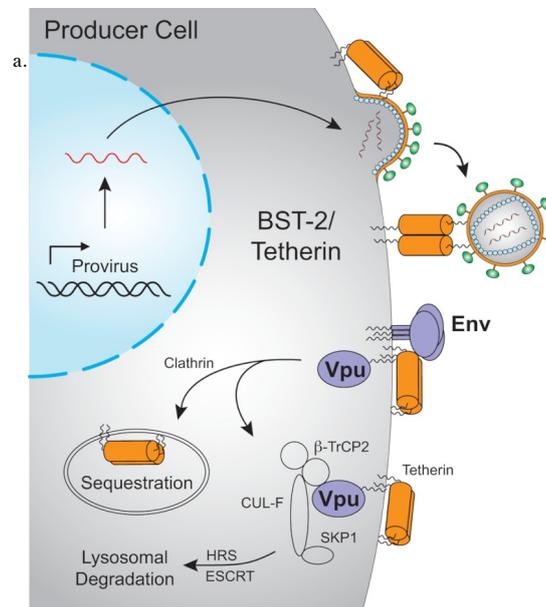


FIGURE 1.24 – a. Mécanisme de la restriction du VIH-1 par la tétherine/BST2. b. Structure de la tétherine ancrée dans les membranes cellulaire et virale. [Harris et al., 2012] et [Malim and Bieniasz, 2012]. La tétherine attache physiquement les virus en bourgeonnement à la surface des cellules infectées. Pour cela, l'extrémité N-terminale est insérée dans la membrane du virus, tandis que l'extrémité C-terminale est ancrée dans la membrane cellulaire. La protéine Vpu du VIH-1 entraîne la relocalisation ou la dégradation de la tétherine.

L'identification de la tétherine (ou BST-2) est basée sur la découverte que la protéine auxiliaire Vpu du virus est requise pour l'infection de certains types cellulaires et facultative pour d'autres. De plus, la dépendance à Vpu apparaît dans des cellules traitées à l'IFN- α [Neil et al., 2007]. En 2008, 2 équipes identifient une protéine transmembranaire, la tétherine, dont la présence impose la dépendance à Vpu [Neil et al., 2008], [Van Damme et al., 2008]. En l'absence de Vpu et en présence de la tétherine, les

particules du VIH-1 s'assemblent mais l'enveloppe lipidique ne se sépare pas de la membrane plasmique. La tétherine retient les virions à la surface des cellules infectées et conduit à leur accumulation dans les endosomes [Neil et al., 2006]. La tétherine est une protéine transmembranaire qui possède une ancre transmembranaire côté N-terminal et une ancre lipidique glycoposphatidylinositol côté C-terminal. Le domaine extracellulaire de la tétherine est une longue hélice α qui adopte une structure dimérique en faisceau d'hélices (coil-coiled) [Kupzig et al., 2003] (cf figure 1.24). Cette structure est renforcée par trois ponts disulfure entre deux monomères de tétherine.

Grâce à ses deux domaines hydrophobes situés aux deux extrémités de la protéine, la tétherine est capable de s'associer simultanément aux membranes virale et cellulaire. Ainsi, lorsque le virus essaie de bourgeonner à la surface des cellules infectées, la tétherine s'incorpore dans la membrane virale et lie physiquement les virions naissants à la cellule [Perez-Caballero et al., 2009], [Hammonds et al., 2010], [Fitzpatrick et al., 2010]. C'est la configuration de la protéine, plus que sa séquence, qui dicte ce phénotype restrictif. Ainsi, une protéine artificielle avec des structures similaires imite efficacement son activité [Perez-Caballero et al., 2009]. De plus, la tétherine exerce son activité d'ancrage sur un large panel de virus enveloppés de structures variées, ce qui indique qu'il n'y a probablement pas besoin de reconnaissance spécifique des protéines virales pour la restriction [Kaletsky et al., 2009], [Mansouri et al., 2009].

Face à ce facteur de restriction, la protéine Vpu du VIH-1 interagit avec la tétherine pour empêcher sa présence au site du bourgeonnement et son incorporation. Vpu et la tétherine colocalisent, interagissent via une interface hélice-hélice et la présence de Vpu diminue la quantité de tétherine à la surface des cellules en perturbant son trafic intracellulaire [Van Damme et al., 2008], [Skasko et al., 2012]. Vpu accélère l'adressage de BST-2 aux lysosomes via la machinerie ESCRT et diminue le recyclage de BST2 à la membrane plasmique [Janvier et al., 2011]. La machinerie ESCRT régule l'adressage des protéines membranaires ubiquitinées vers les corps multivésiculaires (MVB = MultiVesicular Bodies) pour leur dégradation dans les lysosomes. De façon intéressante, BST2 est ubiquitinée via un mécanisme qui n'est pas totalement caractérisé, mais il a été proposé que Vpu induise l'ubiquitination de BST2 sur 2 sérines et une thréonine de la queue cytoplasmique. Trois ubiquitines ligases semblent impliquées : β -TrCP, NEDD4 et MARCH8 [Mitchell et al., 2009], [Mangeat et al., 2009]. Un rôle de certaines protéines autophagiques a également été proposé [Madjo et al., 2016], sans qu'un consensus soit trouvé sur la question.

D'autres virus présentent des mécanismes de défense contre la tétherine : la protéine Nef de plusieurs SIV (chimpanzé, mangabey couronné, singe vert d'Afrique) et du VIH-1 groupe O [Jia et al., 2009], [Zhang et al., 2009], [Kluge et al., 2014] et la protéine d'enveloppe elle-même pour le VIH-2, le SIV_{tan} et le virus K5 du KSHV (Kaposi's sarcoma associated herpes virus) [Le Tortorec and Neil, 2009], [Gupta et al., 2009], [Mansouri et al., 2009].

En plus de son rôle de facteur de restriction, BST-2 possède également la capacité (comme TRIM5 α) de jouer le rôle de PRR [Galão et al., 2012]. La rétention physique des particules induit la phosphorylation d'un domaine conservé dans la queue cytoplasmique de la tétérine. Ceci conduit au recrutement de la kinase Syk (Spleen tyrosine kinase) qui est requise pour l'activation de la voie NF- κ B [Galão et al., 2014].

C.3. SAMHD1

Les cellules myéloïdes comme les macrophages et cellules dendritiques sont plus résistantes à l'infection par le VIH-1 que les lymphocytes T CD4 (cf partie II.B.1.). Si la protéine Vpx du VIH-2/SIV_{mac} est ajoutée dans le milieu en même temps que le VIH-1, l'infection est améliorée [Goujon et al., 2007]. La purification des protéines associées à Vpx et leur analyse par spectrométrie de masse a permis la découverte de SAMHD1 (Sterile alpha motif HD domain 1), dont le rôle est de cliver les dNTP [Berger et al., 2011a], [Hrecka et al., 2011], [Laguette et al., 2011], [Lahouassa et al., 2012].

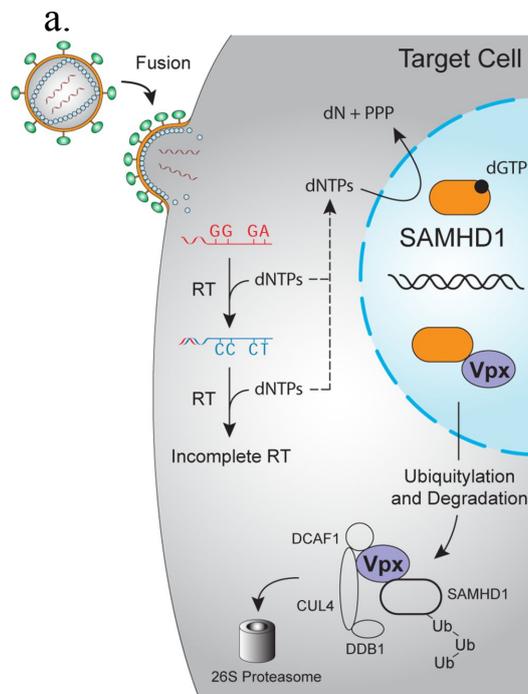


FIGURE 1.25 – **a. Mécanisme de la restriction du VIH-1 par SAMHD1.** **b. Structure de SAMHD1** [Harris et al., 2012], [Ahn, 2016]. SAMHD1 inhibe l'étape de transcription inverse en diminuant la quantité de dNTPs cellulaires dans les cellules myéloïdes. Le domaine HD (en bleu) constitue le site catalytique et le domaine SAM (en violet) permet la multimérisation de la protéine. La protéine Vpx du VIH-2/SIV permet au virus de surmonter cette restriction en adressant SAMHD1 au protéasome pour dégradation.

SAMHD1 comporte 3 régions : le domaine N-terminal qui contient la région SAM, responsable d'une interaction protéine-protéine, le domaine catalytique (domaine HD) et le domaine C-terminal (cf figure 1.25 b.). La fonction biologique précise du domaine N-terminal est inconnue, mais présente une signature de sélection positive, signe d'un site d'interaction entre ce facteur de restriction et un antagoniste viral [Lim et al., 2012]. De plus, cette région comporte une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal) qui n'est pas déterminante pour la restriction du VIH-1, mais est importante pour la dégradation induite par la protéine Vpx du SIV_{mac} [Brandariz-Nuñez et al., 2012]. Le domaine C-terminal, quant à lui, présente des signatures de sélection positive et son importance pour la liaison à Vpx a été proposée [Lim et al., 2012].

La première structure du core catalytique de SAMHD1 indiquait que la protéine active est dimérique et nécessite la présence de dGTP pour son activité catalytique, l'hydrolyse de désoxynucléotides triphosphate en désoxynucléotides et triphosphate inorganique [Goldstone et al., 2011]. Par la suite, il a été proposé que la forme active soit plutôt tétramérique [Yan et al., 2013], ce qui a été confirmé par l'obtention de structures tétramériques [Ji et al., 2013], [Zhu et al., 2013]. Les données cristallographiques et biochimiques ont permis de proposer le mécanisme suivant : une dimérisation de SAMHD1 est induite par le GTP, suivie par une conversion en tétramère catalytiquement actif lors de la liaison d'un dNTP dans le site actif [Hansen et al., 2014].

En plus de son activité dNTPase bien caractérisée, le domaine catalytique de SAMHD1 est capable de se lier à des acides nucléiques, avec une préférence pour l'ARN par rapport à l'ADN [Goncalves et al., 2012]. Une activité exonucléase a été proposée, mais reste sujette à controverse [Beloglazova et al., 2013], [Ryoo et al., 2014], [Seamon et al., 2015]. Ainsi, Beloglazova et al. ont démontré que SAMHD1 possédait une activité exonucléase 3' vers 5' et qu'elle pouvait hydrolyser l'ARN simple brin, l'ADN simple brin et l'ARN dans des duplexes ADN/ARN (avec une cinétique un peu plus rapide pour l'ADN) [Beloglazova et al., 2013]. Cependant, Ryoo et al. ont montré par la suite que SAMHD1 ne possédait qu'une activité RNase et n'avait pas d'activité sur les autres substrats [Ryoo et al., 2014]. Dans les deux cas, l'activité RNase serait indépendante de la multimérisation de SAMHD1. Enfin, Seamon et al. ont proposé que SAMHD1 se lie aux acides nucléiques simple brin sans caractériser d'activité exonucléase et que la liaison à l'ARN simple brin induise l'oligomérisation de SAMHD1 [Seamon et al., 2015].

Le mécanisme de restriction du VIH-1 par SAMHD1 couramment proposé est le contrôle de la quantité de dNTP disponible dans la cellule. Ainsi, en clivant les dNTP en désoxynucléotides et triphosphate, SAMHD1 diminue la quantité de dNTP disponibles pour la RT, ralentissant ainsi cette étape-clé du cycle viral (cf figure 1.25 a.) [Goldstone et al., 2011], [Lahouassa et al., 2012]. L'ADN viral est alors plus longtemps exposé dans le cytoplasme et nous avons émis l'hypothèse que cela pourrait permettre à d'autres facteurs de restriction comme APOBEC3A d'agir. Une étude réalisée au labora-

toire a d'ailleurs permis de mettre en évidence un lien entre cinétique de transcription inverse et édition de l'ADN viral [Nguyen et al., 2015]. Ce mécanisme antiviral permet également d'expliquer comment une protéine nucléaire peut interagir avec une étape cytoplasmique du cycle viral (la RT) et montre que l'effet antiviral d'un facteur de restriction ne nécessite pas obligatoirement une interaction directe entre facteur de restriction et virus.

Un second mécanisme de restriction du VIH-1, basé sur l'activité RNase du site HD de SAMHD1 a été proposé en 2014 [Ryoo et al., 2014]. Cependant, en faisant des purifications successives et en mutant les différents domaines potentiels à activité RNase de SAMHD1, Seamon et al. ont confirmé que la protéine s'associe à l'ARN et présente une activité RNase, mais que le site actif est différent du site d'hydrolyse des dNTP décrit précédemment [Seamon et al., 2015]. Ainsi, SAMHD1 possède bien la capacité à se lier à l'ARN simple brin, mais l'implication d'une activité exonucléase dans la restriction du VIH-1 reste débattue.

Afin de surmonter cette restriction, la protéine Vpx du VIH-2 et du SIV_{sm/mac} conduit à la dégradation de SAMHD1. Vpx sert à recruter un complexe ubiquitine ligase composé des protéines DCAF1, DDB1 et CUL4, qui conduisent à la polyubiquitination de SAMHD1 et à sa dégradation par le protéasome [Laguette et al., 2011], [Hrecka et al., 2011] (cf figure C.3.). Le VIH-1 ne possède pas la protéine Vpx et l'addition de Vpx lors d'une infection par le VIH-1 augmente considérablement l'infection des cellules myéloïdes *in vitro* [Goujon et al., 2008]. Le fait que le VIH-1 ne possède pas la protéine Vpx et que Vpr ne soit pas capable d'entraîner la dégradation de SAMHD1 pourrait s'expliquer par une stratégie d'échappement au système immunitaire. En infectant peu les cellules capables de faire de la présentation antigénique, le virus activerait moins le système immunitaire, ce qui lui permettrait de mieux échapper à la reconnaissance.

C.4. IFITMs

Les facteurs de restriction déjà présentés ne suffisent pas à expliquer la totalité des phénotypes permissifs ou restrictifs observés *in cellulo*. En 2009, une nouvelle famille de protéines antivirales, les IFITM (InterFeron Induced TransMembrane proteins) est caractérisée pour son effet inhibiteur sur le virus de la grippe, de la dengue, du Nil occidental et de la fièvre jaune [Brass et al., 2009].

Chez l'homme, la famille des protéines IFITM comporte 5 membres dont les gènes sont situés sur le chromosome 11 : IFITM1, 2, 3, 5 et 10, ainsi qu'un pseudogène IFITM4 [Hickford et al., 2012]. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire et leur expression est augmentée par stimulation à l'IFN de type I. Seules les trois protéines IFITM1, 2 et 3 ont une activité antivirale. Elles présentent une forte homologie : 91% pour IFITM2 et 3 et 59% pour IFITM2 et 1, IFITM1 étant plus courte de 20 acides aminés (cf figure 1.26 A.). Les IFITMs possèdent deux domaines hydrophobes M1 et M2, séparés par une boucle cytosolique (CIL). Trois topologies ont été proposées (cf figure 1.26 B.) : les extrémités

N et C terminales extracellulaires et les deux domaines hydrophobes transmembranaires, les deux extrémités intracellulaires et les domaines hydrophobes intramembranaires et une conformation mixte avec l'extrémité N-terminale cytoplasmique et l'extrémité C-terminale extracellulaire. Des données suggèrent que le modèle 3 est le plus répandu [Weston et al., 2014], [Bailey et al., 2013]. Les IFITMs, grâce à la présence de deux résidus phénylalanine, sont capables de former des oligomères [John et al., 2013] et IFITM3 subit plusieurs modifications post-traductionnelles (cf figure 1.26) : phosphorylation, palmitoylation (importante pour la fonction antivirale), ubiquitination, monométhylation [Yount et al., 2010], [Jia et al., 2012], [Yount et al., 2012], [Shan et al., 2013].

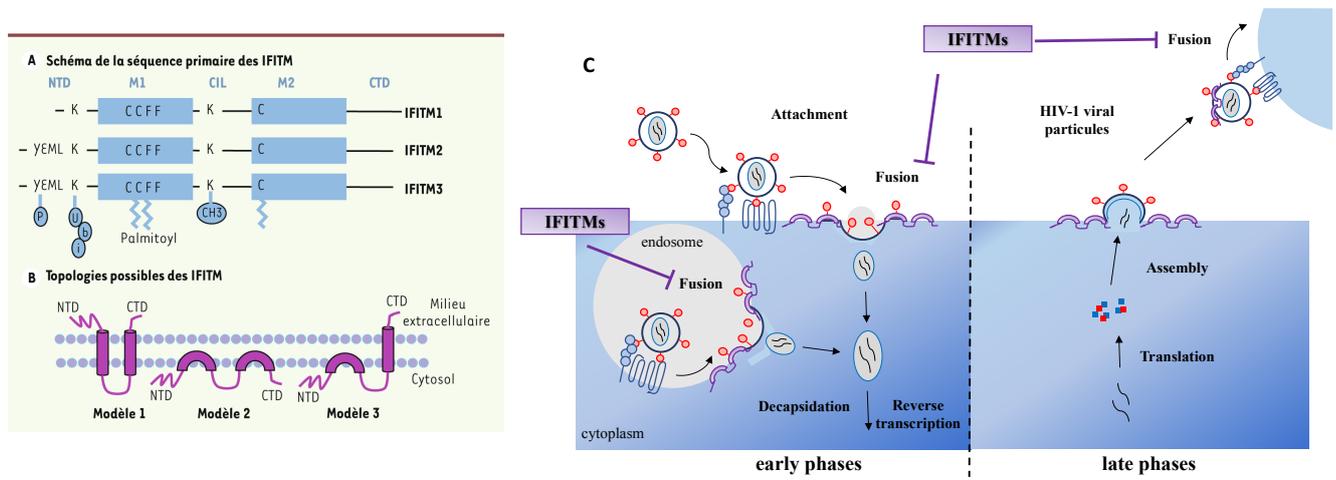


FIGURE 1.26 – **A. Séquence primaire d'IFITM1, IFITM2 et IFITM3 faisant apparaître les modifications post-traductionnelles d'IFITM3. B. Topologies proposées pour les IFITMs. C. Mécanismes pour la restriction virale** [Tartour and Cimarelli, 2015], figure C par Romain Appourchaux.

Les IFITM sont des protéines essentiellement membranaires, mais elles ne se situent pas toutes au même endroit de la cellule : IFITM1 est concentrée à la membrane plasmique, tandis qu'IFITM2 et 3 sont plutôt localisées dans des compartiments intracellulaires (endosomes tardifs voire lysosomes) [Lu et al., 2011], [Feeley et al., 2011], [Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013]. Les IFITM sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, puis elles transitent par le Golgi avant d'atteindre la membrane plasmique. Le complexe AP2, via sa sous-unité m2, est alors capable de reconnaître le motif YEML (absent d'IFITM1) de la queue N-terminale afin d'activer l'endocytose d'IFITM2 et 3. Cette relocalisation peut être contrôlée finement par un jeu de phosphorylation et d'ubiquitination [Chesarino et al., 2014].

Après la découverte des premières propriétés antivirales des IFITM, de nombreuses équipes ont cherché à caractériser les différents virus restreints par ces protéines, ainsi que leurs caractéristiques (cf table 1.5).

Il ressort de cela que les IFITMs sont capables d'inhiber une très large variété de virus, enveloppés ou non, à ARN de différentes polarités. Le mécanisme d'action n'est donc probablement pas spécifique, puisqu'il paraît compliqué que les protéines aient pu s'adapter à autant de virus différents.

La mise en évidence d'un effet des IFITM sur le VIH-1 date de 2011, quand l'équipe du Dr Liang montre qu'en présence d'IFITM, la réplication du VIH-1 est diminuée dans des cellules SupT1 [Lu et al., 2011]. La restriction se produit au moment de l'entrée du virus dans la cellule-cible en inhibant la fusion des membranes, mais le mécanisme précis n'est pas connu (cf figure 1.26 C.) [Li et al., 2013]. Des mécanismes ayant été proposés pour d'autres virus pourraient expliquer cette restriction : une altération des propriétés biophysiques de la membrane ou une modification de son contenu en cholestérol [Desai et al., 2014], [Li et al., 2013], [Lin et al., 2013], [Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013]. Il a également été proposé que les IFITM inhibent la production de Gag [Lu et al., 2011].

Deux études menées au sein du laboratoire et dans l'équipe du Dr Schwartz ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'inhibition du VIH-1 par les IFITM. Ainsi, les protéines IFITM bloquent la transmission d'une cellule T infectée vers une cellule non infectée. La fonction découle principalement d'interactions entre IFITM et virus dans la cellule productrice. Les IFITM, présents à la membrane plasmique de la cellule infectée, colocalisent avec Gag et Env, sont incorporés dans la membrane de la particule virale en bourgeonnement et diminuent l'infectivité des particules virales néoformées (cf figure 1.26 C.) [Tartour et al., 2014], [Compton et al., 2014]. Ce mécanisme antiviral pourrait s'appliquer à d'autres lentivirus, voire à de nombreux virus enveloppés, ce qui permettrait d'expliquer leur large spectre de restriction. Des travaux récents s'intéressant aux modulations des modifications post-traductionnelles des IFITM ont montré que l'ubiquitination et l'endocytose rendaient la protéine moins restrictive pour le VIH-1 mais pas pour la grippe [Compton et al., 2016]. Ainsi, les propriétés des protéines actuelles résulteraient d'un compromis évolutif conduisant à la restriction d'un grand nombre de virus par la même famille de protéines.

Famille	Virus	Génome (polarité)	Dépendance au pH	Enveloppe
Restreints				
Orthomyxoviridae	Grippe A/B	ARN (-)	++	oui
Flaviviridae	Nil occidental, Dengue Hépatite C	ARN (+)	++++	oui
Rhabdoviridae	VSV, Rage	ARN (-)	+++	oui
Filoviridae	Ebola, Marburg	ARN (-)	++	oui
Coronaviridae	SARS	ARN (+)	++	oui
Retroviridae	VIH-1, JRSV	ARN (+) rétrotranscrit	-/+	oui
Bunyaviridae	La Crosse, Hantaan, Andes, fièvre de la vallée du rift	ARN (-)	++	oui
Réoviridae	Réovirus	ARN double brin	++	non
Non restreints				
Retroviridae	MLV	ARN (+)	-	oui
Bunyaviridae	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo	ARN (-)	++	oui
Papillomaviridae	HPV16	ADN double brin brin	++	non
Herpesviridae	HCMV	ADN double brin	Dépendant du type cellulaire	oui
Favorisés				
Coronaviridae	OC43	ARN (+)	++	oui

TABLE 1.5 – **Exemples de virus plus ou moins restreints par les IFITMs** adapté de [Tartour and Cimarelli, 2015]. HCMV : human cytomegalovirus, HPV 16 : papillomavirus humain, JSRV : Jaagsiekte sheep retrovirus, MLV : virus de la leucémie murine, OC43 : coronavirus, SARS : severe acute respiratory syndrome, VSV : virus de la stomatite vésiculaire

C.5. MX2

Une stratégie employée pour découvrir de nouveaux facteurs de restriction consiste à analyser le transcriptome de lignées cellulaires traitées à l'IFN- α et qui sont plus ou moins résistantes au VIH-1. En s'intéressant aux gènes dont l'expression est stimulée par l'interféron- α , plusieurs équipes ont mis en évidence un nouveau facteur de restriction du VIH-1, Mx2 (myxovirus resistance 2) [Goujon

et al., 2013], [Kane et al., 2013], [Liu et al., 2013]. Il s'agit d'une GTPase ressemblant à la dynamine, inductible par l'interféron et qui est localisée au niveau de l'enveloppe nucléaire, des pores nucléaires et dans le cytoplasme. Dans la même famille, Mx1/MxA inhibe la réplication de plusieurs virus à ARN ou ADN, dont le virus de la grippe A et de l'hépatite B, mais pas de rétrovirus [Haller et al., 2015].

L'inhibition du virus se fait après que la RT a synthétisé une certaine quantité d'ADNc, contrairement à ce qu'on observe pour TRIM5 α ou SAMHD1. Bien que le mécanisme précis d'inhibition virale soit inconnu, il semblerait qu'il implique une interaction avec la capsid et se manifeste par le fait que les produits de RT ne rentrent pas dans le noyau. Ainsi, les mutants de capsid connus pour altérer l'import nucléaire confèrent une résistance à Mx2 [Kane et al., 2013]. Bien que le mécanisme antiviral ne soit pas complètement élucidé, il semble que la dimérisation de Mx2 soit importante [Dicks et al., 2016] et que l'interaction entre la région N-terminale de Mx2 et la capsid soit nécessaire à la restriction [Schulte et al., 2015].

C.6. Autres facteurs de résistance

Bien que de nombreux effecteurs anti-VIH aient été caractérisés, ils ne permettent pas d'expliquer complètement la restriction observée dans certaines cellules. Il existe donc de nombreuses études visant à découvrir de nouvelles protéines à rôle antiviral : études protéomiques de virions, études fonctionnelles en surexpression d'ISG caractérisés ... [Usami et al., 2015], [Kane et al., 2016]. Parmi les protéines identifiées récemment, on peut citer SERINC3 et 5 qui sont antagonisées par Nef, ou SLFN11 qui diminue l'expression des protéines virales [Usami et al., 2015], [Li et al., 2012].

Il peut être intéressant de faire la distinction entre facteurs de restriction au sens propre et facteurs de résistance. Contrairement à TRIM5 α , SAMHD1 ou la famille des APOBEC (voir partie suivante), aucun mécanisme d'échappement n'a été décrit pour la restriction par Mx2 ou IFITM. Ces protéines dérivées d'ISG sont donc différentes des facteurs de restriction classiques, pour lesquels des stratégies d'échappement et des interactions directes avec le virus ont pu être mis en évidence. On peut donc proposer de les considérer plus comme des facteurs de résistance, dont l'effet serait maximal lors des phases aiguës de l'infection.

III. Les APOBEC3, cytidines désaminases à multiples rôles

L'étude des protéines APOBEC a commencé avec la découverte en 1987 d'une cytidine modifiée en uracile dans l'ARN messager de l'apolipoprotéine B (*apoB*, essentielle pour le transport du cholestérol) et qui n'était pas encodée génétiquement [Chen et al., 1987], [Powell et al., 1987]. Il s'agit d'une désamination d'une cytidine en uridine, qui porte le nom d'édition de l'ARN (ou editing). Cela a conduit à la découverte de la protéine APOBEC1, une cytidine désaminase zinc-dépendante qui catalyse cette réaction et conduit à l'introduction d'un uracile dans la séquence de l'ARNm. L'édition transforme un codon CAA en UAA et introduit un codon stop ; on obtient alors une apolipoprotéine tronquée (48% de la protéine complète) qui est importante dans l'absorption du cholestérol [Teng et al., 1993], [Jarmuz et al., 2002]. L'enzyme responsable de l'édition prend le nom de APOlipoprotein B Editing Catalytic subunit 1 ou APOBEC1 en 1995, même si aucun autre paralogue n'était connu à l'époque [Davidson et al., 1995].

Chez l'homme, la famille des APOBEC consiste en 11 transcrits primaires et variants d'épissage qui conduisent aux protéines APOBEC1 (A1), Activation-induced deaminase (AID), APOBEC2 (A2), APOBEC3A-H (A3A-H), APOBEC4 (A4). L'identification d'un domaine cytidine désaminase homologue dans la séquence primaire d'AID a permis de postuler qu'AID possédait également une fonction catalytique d'édition. Elle joue effectivement un rôle majeur dans la diversification et la recombinaison des gènes d'immunoglobuline (somatic hypermutation ou SHM et class-switch recombination CSR) [Honjo et al., 2004]. La recombinaison des domaines VDJ des immunoglobulines permet de générer des millions d'anticorps différents. La découverte d'AID et de son activité d'hypermutation a permis de comprendre les mécanismes de régulation fine qui permettent la liaison spécifique des anticorps à de nouveaux antigènes, via les mutations ponctuelles de la région variable [Muramatsu et al., 1999].

APOBEC2 et APOBEC4 sont les moins étudiées à cause de l'absence de phénotype spécifique lié à l'expression de ces protéines. A2 est exprimée dans le coeur et les muscles squelettiques des mammifères [Liao et al., 1999] et sa présence est nécessaire à un bon développement musculaire et à la régénération de la rétine [Sato et al., 2010], [Powell et al., 2014]. Cependant, le mécanisme moléculaire impliqué dans la régénération de la rétine est inconnu et malgré l'absence de consensus, il semblerait que la coordination par le zinc mais pas l'activité désaminase soit impliquée, postulant la nécessité de cofacteurs [Powell et al., 2014]. Des études récentes suggèrent un lien entre l'expression d'A2 et le cancer du foie via des mutations dans les gènes de Eif4g2 (eukaryotic translation initiation factor 4 γ 2) et Pten (Phosphatase and tensin homolog) [Okuyama et al., 2012]. APOBEC4 est exprimée dans les testicules et il a été proposé qu'elle joue un rôle dans la spermatogénèse en éditant certains ARNm clés [Rogozin et al., 2005]. Il a également été proposé récemment qu'elle ait un rôle dans la modulation des promoteurs de l'hôte ou des LTR endogène [Marino et al., 2016].

A. La famille des APOBEC3

Les APOBEC3 sont une famille de 7 paralogues dans le génome humain : A3A, A3B, A3C, A3D/E, A3F, A3G, A3H, dont les gènes sont tous situés sur le chromosome 22 [Jarmuz et al., 2002]. Les principales caractéristiques de la famille sont décrites dans le tableau 1.27.

Protéine	Expression	Localisation cellulaire	Cofacteurs/interactions	Capacité de liaison	Séquence (C = site d'édition)	Éléments génétiques ciblés
APOBEC3A	Monocytes/macrophages, kératinocytes	N/C (modulation selon le type cellulaire ?)	Vpx du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	AAV-2; rétrovirus, rétroéléments, ARNm de WT1, SDHB, SIN3A
APOBEC3B	Cellules cancéreuses induits à PKC, hépatocytes activés à l'IFN- α	N	?	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	Rétroéléments, SIV, HBV, HPV, proto-oncogènes
APOBEC3C	Cellules du sang périphérique	N/C	Vif et Gag (MA) du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	SIV, rétroéléments
APOBEC3D/E	Cellules du sang périphérique	C	Vif et Gag (NC) du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	VIH, rétroéléments
APOBEC3F	Cellules du sang périphérique, hépatocytes activés à l'IFN- α	C	Vif et Gag (NC) du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	Rétrovirus, rétroéléments, HBV
APOBEC3G	Cellules du sang périphérique, hépatocytes activés à l'IFN- α	C	Vif et Gag (NC) du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-CC-3' (préférence), 5'-TC-3' (plus rare)	Rétrovirus, rétroéléments, HBV
APOBEC3H	Cellules du sang périphérique	N/C	Vif et Gag (NC) du VIH	ADN simple brin, ARN	5'-TC-3' (préférence)	Rétrovirus, rétroéléments

FIGURE 1.27 – **Caractéristiques des APOBEC3** adapté de [Salter et al., 2016]. N = nucléaire, C = cytoplasmique. Le C représente le site d'édition. AAV = Adéno-Associated Virus, SIV = Simian Immunodeficiency Virus, HBV = virus de l'hépatite B, HPV = Papillomavirus humain

A.1. Mécanisme de désamination de l'ADN

L'activité biochimique fondamentale des enzymes de la famille des APOBEC est la désamination des cytidines de l'ADN. Cette activité a été démontrée dans plusieurs essais expérimentaux biochimiques et virologiques [Harris et al., 2002], [Desimmie et al., 2014]. APOBEC désamine les cytidines en uraciles (C vers U) de façon largement spécifique des substrats ADN simple brin et elle a besoin de cinq nucléotides contigus : 3 bases côté 5' et une base côté 3' par rapport à la cytidine ciblée (cf figure 1.28) [Harjes et al., 2013]. A3A est également capable de désaminer les cytidines méthylées en thymidines, propriété qui n'est pas partagée par A3G [Carpenter et al., 2012].

La désamination se fait par un mécanisme d'hydrolyse catalysée par le zinc. Dans le site actif, un résidu acide glutamique conservé protone l'eau et l'ion hydroxyde stabilisé par le zinc attaque la position 4 de la nucléobase cytidine, avec le remplacement d'un groupe amine (NH_2) par un groupe carbonyle ($\text{C}=\text{O}$). On obtient ainsi une base uracile à la place de la cytidine et la libération d'une molécule de NH_3 .

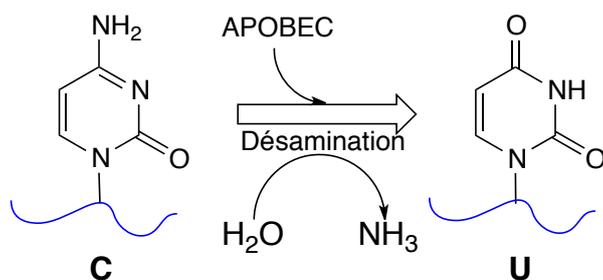


FIGURE 1.28 – Schéma de la désamination des cytosines de l'ADN simple brin catalysée par les membres de la famille des APOBEC adapté de [Harris and Dudley, 2015].

Le mécanisme d'action des APOBEC3 est favorisé thermodynamiquement et en plus de cela, un certain contexte est privilégié pour le site d'édition. Tandis qu'APOBEC3G préfère que la cytosine cible soit précédée d'une autre cytosine, les autres APOBEC3 préfèrent un motif TC [Carpenter et al., 2010], [Rathore et al., 2013]. Il a également été proposé que les structures secondaires de l'ADN jouent un rôle dans le choix du site d'édition [Holtz et al., 2013].

A.2. Structure des protéines

Des structures haute résolution des sites catalytiques des APOBEC3, obtenues par cristallographie et diffraction des rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de mettre en évidence les caractéristiques communes de la famille [Holden et al., 2008], [Byeon et al., 2013], [Bohn et al., 2013], [Shi et al., 2015]. La structure de la protéine entière n'est connue que pour A3A et A3C et il n'existe qu'un modèle basse résolution pour A3G [Kitamura et al., 2012], [Wedekind et al., 2006].

Chaque membre de la famille des APOBEC3 possède un (A3A, A3C, A3H) ou deux (A3B, A3D/E, A3F, A3G) domaines conservés capables de coordonner un atome de zinc (ZDD pour Zinc-dependant Deaminase Domain) (pour revue, voir [Desimmie et al., 2014]). La structure globale des protéines est globulaire, avec 5 feuillets β et six hélices α (cf figure 1.29 A.). Les feuillets β forment un coeur hydrophobe avec les hélices α positionnées autour de ce coeur. Le domaine catalytique C-terminal d'A3G, le premier à avoir été caractérisé, illustre plusieurs caractéristiques structurales conservées dans les A3 avec une structure super-secondaire $\alpha - \beta - \alpha$ qui forme le domaine cytosine désaminase (CDA). Les variations de longueur, composition, localisation spatiale des boucles séparant ces structures conservées régulent la fonction, la spécificité de substrat, la catalyse et l'oligomérisation. Chaque domaine catalytique possède une organisation similaire His-X-Glu-X₂₃₋₂₈-Pro-Cys-X₂₋₄-Cys où His, Glu, Cys et Cys sont nécessaires à la catalyse (cf figure 1.29 B.). L'histidine et les deux cystéines sont responsables de la coordination du zinc, tandis que l'acide glutamique permet le transport de protons dans le site actif [Jarmuz et al., 2002].

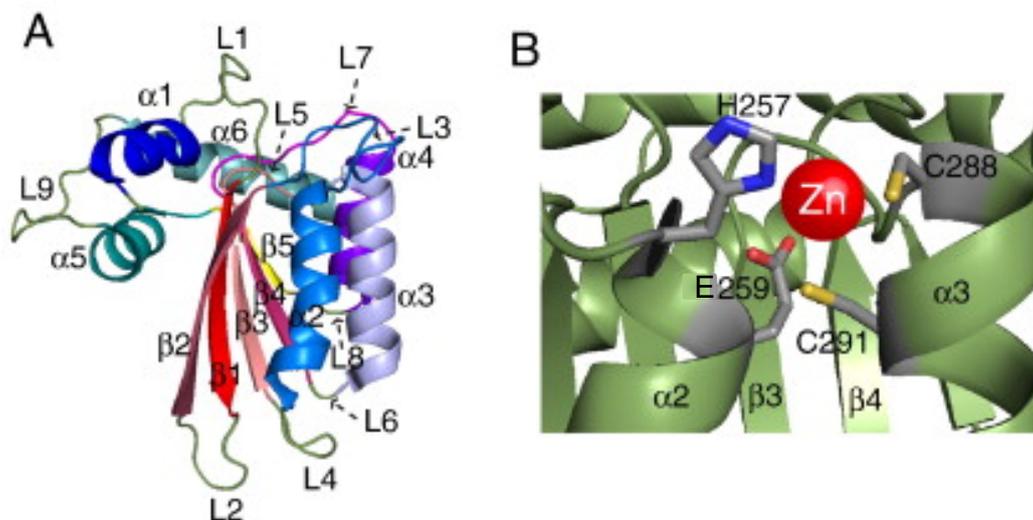


FIGURE 1.29 – **Structure modèle de la famille des APOBEC3** adapté de [Desimmie et al., 2014]. A. Les A3 possèdent un core composé de 5 feuillets β et de 6 hélices α . Le prototype de la famille est le domaine C terminal d'A3G représenté ici (référence PDB : 3IQS). B. Le site actif d'A3G, avec 4 acides aminés importants : H257, C288, C291, E259 et un atome de zinc.

Le degré d'oligomérisation des protéines A3 a des effets sur la catalyse, l'association aux acides nucléiques et la distribution cellulaire, bien qu'il n'y ait pas de consensus sur le degré d'oligomérisation des A3 catalytiquement inactives. Il semblerait qu'A3A et A3C soient monomériques tandis qu'A3B, A3D, A3F, A3G et A3H seraient capables de former des dimères ou des oligomères dans des complexes de haut poids moléculaire [Li et al., 2014]. A3A est monomérique en solution et lorsqu'elle se lie à l'ADN, mais il a été proposé qu'une dimérisation soit responsable d'une régulation de son activité [Shlyakhtenko et al., 2014], [Bohn et al., 2015].

A.3. Interactions des APOBEC3 avec les acides nucléiques

a) Aspects biochimiques de l'interaction

Tous les A3 sont capables d'interagir avec les acides nucléiques (ADN simple brin et ARN), bien que le domaine désaminase situé en N-terminal d'A3B, A3F et A3G ne possède pas d'activité catalytique. L'interaction des A3 avec les acides nucléiques repose sur l'interaction entre des résidus chargés positivement et des acides aminés aromatiques de la protéine d'une part et le squelette phosphate et les nucléobases de l'ADN d'autre part [Aydin et al., 2014].

L'ADN simple brin s'associe à la protéine A3G au niveau du CDA C-terminal actif mais aussi du CDA N-terminal inactif. Cette liaison des dimères d'A3G à l'ADN permet la formation d'un homotétramère catalytiquement actif [Polevoda et al., 2015a], [McDougall et al., 2011]. L'oligomérisation des A3 à simple ou double domaine désaminase pourrait donc permettre de renforcer les interactions avec

l'ADN simple brin. A3A se distingue de ce modèle avec un ADN simple brin très courbé qui s'insère dans une poche catalytique plus profonde et la protéine semble agir de façon non processive [Byeon et al., 2013], [Logue et al., 2014].

Les A3 sont également capables de s'associer de façon non-spécifique aux ARN cellulaires et viraux (pour revue, [Prohaska et al., 2014]). Les A3 possédant deux domaines désaminase se lient préférentiellement à l'ARN via leur CDA N-terminal non catalytique et au moins pour A3G, le CDA C-terminal est également impliqué [Polevoda et al., 2015b]. Les A3 liées à un ARN sont catalytiquement inactives vis à vis de l'ADN simple brin, suggérant deux mécanismes possibles : un mécanisme d'inhibition compétitive où les deux types d'acides nucléiques sont en compétition pour le même site d'interaction ou une modification conformationnelle qui modifie la structure du site actif par allostérie et empêche la liaison à l'ADN [Iwatani et al., 2006], [Wedekind et al., 2006].

Il semble qu'A3A soit capable de lier l'ADN simple brin et l'ARN et que son affinité pour l'ARN soit supérieure à celle pour l'ADN ($K_{dARN} = 40 \mu\text{M}$ et $K_{dADN} = 80 \mu\text{M}$) [Byeon et al., 2013].

b) Restriction des rétroéléments endogènes

Les protéines A3, grâce à leur capacité à interagir avec l'ADN et l'ARN, sont actives contre les rétroéléments endogènes. Chez l'homme, il existe des séquences de rétrovirus endogènes (ERV) qui utilisent les LTR pour s'insérer dans le génome de l'hôte de façon analogue à ce qui est observé pour les rétrovirus exogènes (cf partie B.). Des empreintes d'hypermutations liée à A3G et A3F ont été identifiées dans les éléments ERV-K et ERV-1, témoins d'une activité passée des A3 contre les ERV [Anwar et al., 2013]. Il existe également des rétroéléments (fonctionnels ou non) qui ne contiennent pas de LTR : les rétroéléments autonomes LINE (long interspersed nuclear elements) et non autonomes SINE (short interspersed nuclear elements). Ces éléments pouvant constituer une menace pour l'intégrité du génome cellulaire, tous les A3 sont capables de les inhiber [Kinomoto et al., 2007], soit en hypermutant l'ADN simple brin, soit en inhibant la transcription inverse des rétroéléments [Bogerd et al., 2006], [Stenglein and Harris, 2006]. D'autres part, A3G pourrait inhiber l'activité des SINE par un mécanisme indépendant de l'activité désaminase, en se liant à l'ARN des SINE et en les séquestrant dans des complexes ribonucléoprotéiques dans le cytoplasme [Chiu et al., 2006]. De façon plus globale, le nombre élevé de paralogues chez l'homme (sept) ainsi que la variabilité de séquences indiquent que les A3 ont des fonctions essentielles dans l'organisme parmi lesquelles la protection contre la menace génotoxique constituée par les rétroéléments endogènes.

c) Dégradation des ADN étrangers ou de l'ADN du soi cytoplasmique

Il existe plusieurs mécanismes permettant d'éliminer l'ADN étranger dans les cellules de l'hôte et les APOBEC3 y participent. La détection d'ADN dans le cytoplasme par TLR9 s'accompagne d'une

production d'IFN qui stimule l'expression des ISG, dont les A3 font partie. En particulier, A3A, A3C et A3G sont fortement surexprimées dans les monocytes et les macrophages après transfection d'un ADN étranger [Stenglein et al., 2010]. A3A (ainsi qu'A3C et A3F dans une moindre mesure) est alors capable d'éditer l'ADN incriminé et les uraciles obtenues vont être repérées par la machinerie de réparation de l'ADN. L'uracile-ADN glycosylase UNG2 excise les uraciles mal incorporés dans l'ADN et va donc cliver la base azotée éditée par A3A. Ce site abasique sera à son tour le substrat d'une endonucléase comme APEX ou TREX, qui coupe le squelette phosphodiester de l'ADN [Stenglein et al., 2010].

L'activité éditrice des A3 ne s'arrête pas à l'ADN étranger et l'ADN du soi peut également être ciblé.

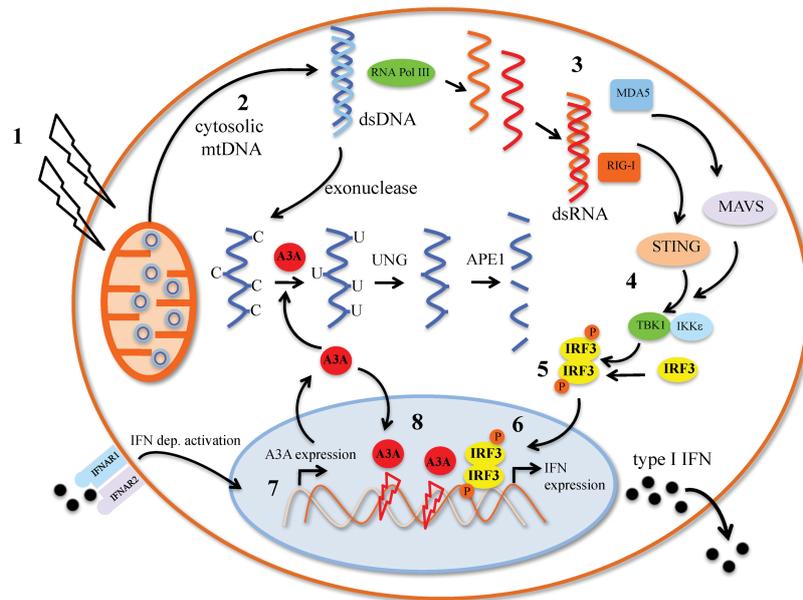


FIGURE 1.30 – L'ADN cytosolique induit une réponse immunitaire innée qui stimule l'expression d'A3A [Suspène et al., 2017]. L'ADN cytosolique induit la voie de l'ARN polymérase III/RIG-I et conduit à la sécrétion d'IFN de type I. Il induit de façon autocrine ou paracrine l'expression d'A3A qui va éditer l'ADN cytosolique, conduisant à sa dégradation. A3A a la capacité d'entrer dans le noyau, elle va également hypermuter l'ADN nucléaire et conduire à la formation de cassures double brin.

Lorsque l'ADN du soi est présent dans le cytoplasme, la cellule repère cette localisation anormale via la polymérase III et RIG-I (cf figure 1.30). La transduction du signal via STING et IRF3 conduit à la production d'IFN de type I qui est capable de stimuler la cellule de façon autocrine ou paracrine pour conduire à une augmentation de l'expression des A3, notamment A3A [Suspène et al., 2017]. L'ADN mitochondrial et l'ADN cellulaire anormalement présent hors du noyau sont alors désaminés par les A3 (A3A, A3C, A3F, A3G et A3H), selon des motifs 5'TC et 5'CC et cette restriction a lieu hors de la mitochondrie, dans le cytoplasme [Suspène et al., 2011a], [Carpenter et al., 2012], [Suspène

et al., 2017]. La capacité d'A3A à désaminer aussi bien les cytidines classiques ou méthylées permet une élimination efficace de cet ADN cytoplasmique. Hors, A3A, A3C et A3H sont localisées dans le cytoplasme et dans le noyau (cf tableau 1.27) et cette caractéristique les amène à proximité de l'ADN génomique cellulaire ce qui peut engendrer des effets néfastes pour la cellule. La surexpression d'A3A en réponse à un ADN du soi détecté dans le cytoplasme se traduit par des cassures double brin de l'ADN génomique, dont les conséquences peuvent être mortelles pour la cellule (cf partie III.C.).

Les A3A de différentes espèces de mammifères (homme, singe rhésus, tamarin, mouton, vache, chien, panda et cheval) sont également capables d'hypermuter l'ADN génomique, suggérant que cette activité a été conservée sur 148 millions d'années d'évolution [Caval et al., 2014b].

Les observations sur le caractère génotoxique d'A3A permettent d'entrevoir les conséquences complexes de son expression : A3A possède à la fois des effets bénéfiques (dégradation des ADN mal localisés) et néfastes (induction de dommages dans l'ADN cellulaire) pour la cellule. Cela soulève la question de la régulation de l'activité d'A3A dans les cellules où elle est exprimée.

d) Édition des ARN cellulaires

Bien que le substrat préférentiel des A3 soit l'ADN simple brin, une activité éditrice de l'ARN par A3A a été rapportée en 2015. Le gène *WT1*, impliqué entre autres dans la leucémie myéloïde chronique (AML), est muté dans des cellules du sang de cordon [Niavarani et al., 2015]. A3A dans les monocytes et les macrophages inflammatoires possède également la capacité d'éditer certains ARN de façon spécifique, à l'instar de A1 dans le foie et l'intestin [Sharma et al., 2015]. Dans les monocytes et les macrophages, un stress hypoxique ou une stimulation IFN entraînent une surexpression d'A3A et une activité d'édition de l'ARN enrichie dans les gènes de la signalisation de l'intégrine, des maladies d'Alzheimer, Huntington et Parkinson. Une étude de 2016 a permis de caractériser plus largement les gènes ciblés par l'édition liée à APOBEC3A. On retrouve des gènes liés au cancer du sein, aux cancers hématologiques, à la sclérose latérale amyotrophique, à la maladie d'Alzheimer et à l'hypertension pulmonaire primaire [Sharma et al., 2016a].

Alors qu'on pensait qu'A3G se liait à l'ARN sans effet catalytique, il a récemment été montré qu'A3G est également capable d'éditer des ARN, principalement de gènes impliqués dans la réplication du VIH-1 [Sharma et al., 2016b].

La découverte de ces propriétés des A3 permet d'imaginer de nouveaux mécanismes de restriction antiviraux qui viendraient s'ajouter à ceux déjà connus.

B. Rôle antiviral des APOBEC3

B.1. Les APOBEC3, facteurs de restriction du VIH-1

a) Activité anti-VIH d'A3G

En l'absence de Vif, la réplication du VIH est fortement inhibée dans les lymphocytes T primaires humains, ainsi que dans certaines lignées cellulaires comme les CEM, qu'on appelle lignées non-permissives. Dans d'autres lignées (SupT1, CEM-SS et HEK 293T), le VIH Δ Vif se réplique très bien, on parle alors de cellules permissives. En fusionnant des cellules plus ou moins permissives à l'infection par le VIH, il a été établi que le phénotype non permissif est dominant et l'hypothèse d'un facteur antiviral contrecarré par Vif a été formulée [Madani and Kabat, 1998], [Simon et al., 1998]. En 2002, le gène responsable de ce phénotype est identifié, *CEM15*, plus connu sous le nom d'APOBEC3G [Sheehy et al., 2002]. La protéine possède une activité cytidine désaminase connue [Harris et al., 2002] et un mécanisme de désamination de l'ADNc viral a rapidement été proposé [Harris et al., 2003], [Mangeat et al., 2003], [Zhang et al., 2003]. Cela a permis d'expliquer des phénomènes de mutation G vers A dans l'ADN rétroviral précédemment observés. Le modèle de restriction par A3G est présenté en figure 1.31 : en l'absence de Vif, A3G forme des complexes ribonucléoprotéiques cytoplasmiques avec la protéine Gag du VIH-1, l'ARN génomique viral et une ou plusieurs espèces d'ARN cellulaire [Apolonia et al., 2015]. L'incorporation d'A3G dans la particule virale dépend de l'interaction entre A3G et la nucléocapside de Gag, qui est également capable d'interagir avec de l'ARN. Il a été proposé que l'ARN fasse un pont entre NC et A3G [Schafer et al., 2004], [Apolonia et al., 2015]. Bien que le mécanisme précis ne soit pas connu, il y a un consensus sur le fait qu'une interaction ARN-protéine soit à l'origine de l'incorporation d'A3G dans la particule virale du VIH-1. La capacité d'A3G à former des oligomères dans les cellules est corrélée à son activité antivirale et l'activité d'A3G est régulée par son degré d'oligomérisation [Li et al., 2014].

Lors du bourgeonnement et avant que la capsid virale ne se referme complètement, une proportion non négligeable d'enzymes A3G est encapsidée grâce à leur interaction avec NC. Lorsque la particule virale infecte une nouvelle cellule, après attachement au récepteur et fusion des membranes, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme. La transcription inverse ainsi que l'activité RNaseH de la RT se mettent en place conduisant à la synthèse d'un ADN viral simple brin, cible préférentielle d'A3G. Grâce à la proximité spatiale (puisque A3G a été co-encapsidée), l'enzyme de restriction désamine les cytidines de l'ADN viral néoformé, dans un contexte nucléotidique 5'-CC. Lorsque la RT utilise ce brin d'ADN néosynthétisé comme matrice pour générer le brin complémentaire d'ADN génomique (+), elle insère des adénines en face des uraciles par complémentarité [Harris et al., 2003], [Mangeat et al., 2003]. Cela conduit à des mutations génomiques de G vers A dans l'ADN viral, de 5'-GG vers 5'-AG, pouvant mener à l'apparition de codons stop prématurés. En un seul cycle de réplication, les mutations induites

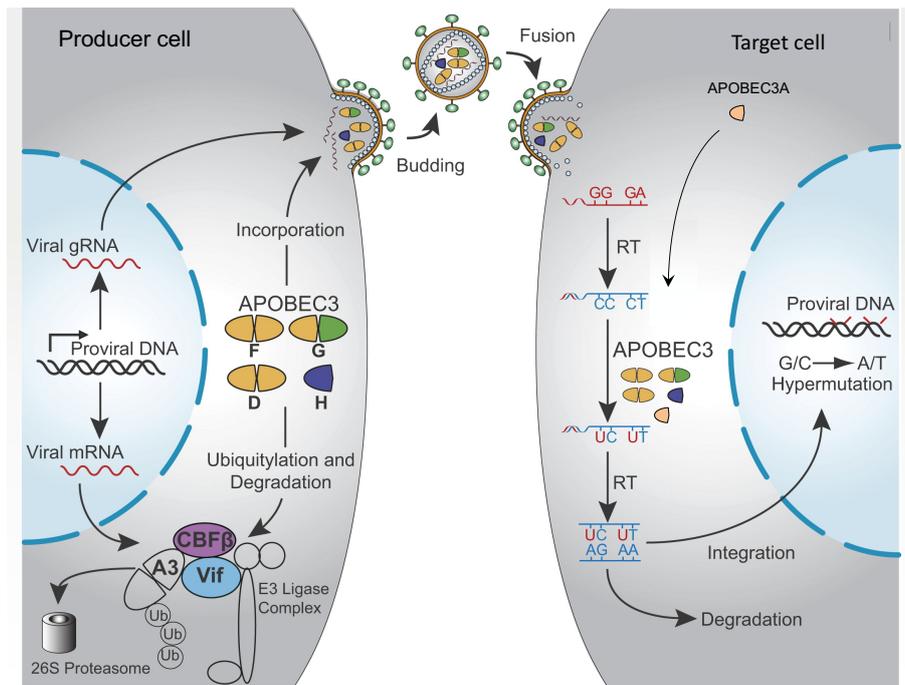


FIGURE 1.31 – **Restriction du VIH-1 par les APOBEC3** adapté de [Harris and Dudley, 2015]. En l'absence de Vif, A3D/F/G/H sont incorporées dans la particule virale en formation. Lorsque la RT a lieu dans la cellule-cible, les cytidine désaminases associées au virus éditent l'ADN viral néoformé, conduisant à un génome hypermuté qui sera partiellement dégradé. A3A n'est pas incorporée dans la particule virale, elle est présente dans la cellule cible et s'attaque au virus entrant. En présence de Vif dans la cellule productrice, les A3D/F/G/H sont ubiquitinées et dégradées par le protéasome 26S.

par les A3 peuvent conduire à 10% de conversion des guanines en adénines sur le brin (+) [Harris et al., 2003]. Ces mutations ne sont pas réparties de façon homogène le long de la séquence virale, mais présentent une concentration en 5' du cPPT et du PPT du LTR [Suspène et al., 2006]. Il a été proposé que le génome hypermuté soit alors reconnu par l'uracile ADN glycosylase UNG2 qui cliverait les uraciles, générant des sites abasiques. Ces sites seraient à leur tour reconnus par une endonucléase comme APE1 et cela conduirait à une dégradation du matériel génétique viral [Yang et al., 2007], [Hrecka et al., 2016].

Un autre mécanisme de restriction, indépendant de l'activité désaminase a été mis en évidence par l'utilisation de mutants catalytiquement inactifs d'A3G [Iwatani et al., 2007]. Un certain nombre de modèles a été proposé pour cette restriction, incluant la liaison à l'ARN génomique pour empêcher la transcription inverse par gêne stérique (pour revue, voir [Holmes et al., 2007]). Bien que ce mécanisme semble minoritaire dans le cas de la restriction du VIH-1, c'est le mécanisme principal pour d'autres éléments génétiques (voir III.B.2.).

Le virus possède la protéine Vif, qui lui permet de surmonter cette restriction. L'expression de Vif est requise dans les cellules productrices et non dans les cellules cible de l'infection : en l'absence de

Vif dans les cellules productrices, l'accumulation d'ADN viral dans les cellules cible est diminuée. Cela s'explique par un adressage d'A3G au protéasome médié par Vif, qui conduit à la dégradation de la protéine [Sheehy et al., 2003], [Marin et al., 2003], [Hultquist et al., 2011]. Vif recrute le complexe ubiquitine-ligase E3, formé des protéines CUL5 (culline 5), ELOB/C (Elongin B/C), Rbx1 et Nedd8. Cette association est stabilisée par la présence de la protéine CBF β et déclenche l'ubiquitination d'A3G et sa dégradation par le protéasome 26S [Yu et al., 2003], [Jager et al., 2011] (cf figure 1.31).

Ainsi, en diminuant la quantité d'A3G disponible dans la cellule, Vif empêche son incorporation dans la particule virale et permet de lever la restriction.

b) Les autres membres de la famille APOBEC3 (B à H)

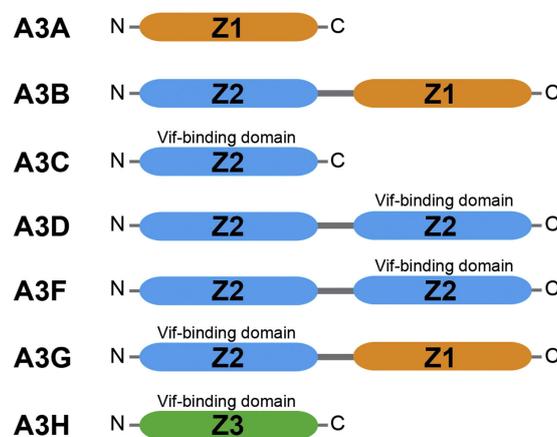


FIGURE 1.32 – **Organisation en domaines des membres de la famille des A3** adapté de [Aydin et al., 2014]. Toutes les protéines A3 comportent un (A3A, A3C, A3H) ou deux (A3B, A3D, A3F, A3G) domaine(s) cytidine désaminase. Les domaines catalytiques sont classés en 3 sous-catégories (Z1, Z2, Z3) selon leur séquence.

Tous les membres de la famille des A3 possèdent une activité antivirale (cf figure 1.27) en ciblant soit le VIH, soit d'autres virus, de façon dépendante ou indépendante de leur activité cytidine désaminase. A3D/E, A3F et A3H (haplotype II, V et VII) sont exprimées dans les lymphocytes T CD4 en réponse à l'infection par le VIH, sont incorporées dans les particules virales et génèrent des mutations de l'ADN proviral [Hultquist et al., 2011]. Contrairement à A3G qui exerce son activité cytidine désaminase en contexte 5'-CC, les autres A3 agissent préférentiellement dans un contexte 5-TC [Salter et al., 2016]. Ces résultats obtenus dans des modèles de culture cellulaire ont été confirmés en utilisant des souris humanisées [Sato et al., 2014].

Le rôle d'A3B dans la restriction du VIH-1 est controversé : bien que des études en cellules HEK 293T aient montré un effet inhibiteur de la répllication, ainsi qu'une interaction avec Vif conduisant à

une dégradation d'A3B, il semble qu'A3B ne soit pas un facteur de restriction du VIH en lymphocytes T CD4 [Doehle et al., 2005], [McDougle et al., 2013], [Land et al., 2015]. APOBEC3C est un faible inhibiteur du VIH mais a conservé un domaine de liaison à Vif [Bishop et al., 2004], [Zhang et al., 2016].

APOBEC3H est le membre de la famille des A3 le plus éloigné d'un point de vue évolutif et il contient un domaine coordinateur du zinc Z3, différent des domaines Z1 et Z2 trouvés chez les autres membres de la famille (cf figure 1.32) [OhAinle et al., 2006]. Il existe sept haplotypes d'A3H chez l'homme et quatre variants alternatifs d'épissage [Gu et al., 2016]. Les différents haplotypes d'A3H possèdent des activités antivirales variables et seuls les haplotypes II, V et VII sont capables de restreindre le VIH Δ Vif, selon des mécanismes dépendant ou non de l'activité désaminase. [Wang et al., 2011]. Les haplotypes possédant une capacité de restriction sont également ceux qui sont ciblés par la protéine virale Vif, renforçant l'idée qu'A3H est un facteur de restriction du VIH [Refsland et al., 2014].

À l'instar de ce qui est observé pour A3G, une restriction par un variant catalytiquement inactif d'A3F a également été caractérisée. Le modèle principal pour expliquer ce phénomène est basé sur une liaison des protéines APOBEC à l'ARN viral qui bloque la transcription inverse du génome. Pour résumer, dans les cellules T CD4, la restriction est due à des mécanismes d'édition ou indépendants de l'édition, surtout médiés par A3G et dans une moindre mesure par A3F et A3D [Chaipan et al., 2013], [Gillick et al., 2013].

c) **APOBEC3A, une cytidine désaminase pas comme les autres**

APOBEC3A est le seul membre de la famille des APOBEC3 qui n'a pas d'activité antivirale contre le VIH-1 ou le VIH-1 Δ Vif après surexpression en cellules HEK 293T ou HeLa. Cela s'explique par le fait que pas ou peu d'A3A est incorporé dans la particule virale en comparaison avec ce qu'on observe pour A3G [Bishop et al., 2004]. L'incorporation artificielle d'A3A dans les particules virales grâce à l'utilisation de protéines chimériques (A3A-Vpr ou A3A fusionnée à l'extrémité N-ter d'A3G) conduit à une restriction du VIH par A3A et cette restriction passe par une hypermutation du génome viral [Goila-Gaur et al., 2007], [Aguiar et al., 2008]. De manière intéressante, A3A-Vpr est insensible à Vif tandis que A3G-A3A y est sensible, suggérant qu'A3A seule n'est pas dégradée par Vif. Ces études ont été réalisées dans des cellules HeLa et HEK 293T, où l'expression d'A3A est absente. *In vivo*, A3A est exprimée dans les populations cellulaires différenciées : monocytes, macrophages, cellules dendritiques et kératinocytes [Peng et al., 2007], [Vartanian et al., 2008]. Les monocytes sont plus résistants à l'infection par le VIH que les macrophages et cellules dendritiques (cf partie B.1.) et il est intéressant de noter que cette résistance est corrélée avec le niveau d'expression des A3, en particulier d'A3A. Ainsi, A3A est fortement exprimée dans les monocytes et le niveau d'expression diminue lorsque la cellule se

différencie en macrophage, ce qui contribue à rendre la cellule plus susceptible à l'infection par le VIH. Une modulation de l'expression d'A3A (stimulation par l'IFN- α ou knock down) se traduit par une modulation de la susceptibilité cellulaire au VIH-1 [Peng et al., 2007], [Vázquez et al., 2011]. Plusieurs autres études ont témoigné d'une importante expression d'A3A spécifique des cellules myéloïdes et fortement augmentée par une stimulation à l'IFN- α [Koning et al., 2009], [Refsland et al., 2010]. Enfin, une activité cytidine désaminase importante (motif 5'TC) est détectée dans les monocytes traités à l'IFN- α . Cette activité est due à A3A, qui est exprimée sous forme de deux isoformes d'environ 20 kDA. Deux méthionines initiatrices en contexte Kozak adéquat sont présentes dans la séquence d'A3A en position 1 et 13. Deux protéines sont donc produites à partir d'un même ARN messenger, indiquant qu'il s'agit probablement d'un site interne d'entrée du ribosome [Thielen et al., 2010].

Ces constats ont conduit à une étude au sein du laboratoire sur les relations entre A3A exprimée en cellules myéloïdes et VIH-1 [Berger et al., 2011b]. Cette étude a permis de confirmer qu'A3A était préférentiellement exprimée dans les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) par rapport aux lymphocytes du sang périphérique et que cette expression est stimulée par l'infection par le VIH. La restriction du VIH en cellules myéloïdes est due à une activité cytidine désaminase d'A3A, avec une préférence pour un motif 5'TC (à la différence du motif 5'CC ciblé par A3G) [Berger et al., 2011b], [Koning et al., 2011]. La désamination s'accompagne d'une forte limitation de l'accumulation d'ADN viral, sans pour autant diminuer la vitesse de RT. La quantité de sites édités détectée n'est pas suffisante pour expliquer la diminution de l'ADN viral, mais il est possible qu'une partie du génome édité soit détruit ou réparé par la cellule. Il est également possible que l'activité d'A3A soit partiellement indépendante de son activité désaminase, comme c'est le cas pour A3G.

Alors qu'A3G est dégradée par Vif, l'effet de cette protéine virale est bien moindre sur A3A. En présence de Vpx du SIV_{sm}/VIH-2, l'infection des cellules myéloïdes par le VIH-1 est beaucoup plus efficace [Goujon et al., 2007]. Les travaux menés au laboratoire ont permis de démontrer qu'A3A est ciblée par la protéine Vpx du SIV de macaque et que cette interaction conduit à une dégradation d'A3A par le protéasome [Berger et al., 2011b]. Une autre étude a montré un résultat similaire avec la protéine Vpx du SIV_{smm} [Berger et al., 2010]. Les protéines Vpx des SIV/VIH-2 permettraient donc aux virus concernés d'échapper partiellement à la restriction.

Ces résultats permettent de dégager des caractéristiques essentielles d'A3A en comparaison avec les autres protéines A3. L'activité anti-VIH d'A3A semble dépendante du type cellulaire (spécifiquement restreinte aux cellules myéloïdes différenciées), son action antivirale a lieu dans la cellule-cible et la protéine A3A n'est pas incorporée dans la particule virale. On peut se demander si ce comportement particulier d'A3A est spécifique de la restriction du VIH ou s'il est conservé lorsqu'on s'intéresse à d'autres virus.

B.2. Les APOBEC3 sont des facteurs de restriction pour de nombreux virus à ARN ou à ADN

Les APOBEC3 de l'homme sont capables de restreindre un grand nombre de virus à ARN : HTLV-1, MLV, virus Foamy ainsi que des virus à ADN : AAV, VHB, VPH, HSV-1 et EBV.

a) Inhibition des rétrovirus à ARN par hypermutation des génomes viraux

Le virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1) est un *Retroviridae* de la famille *Deltaretrovirus* (cf figure 1.5). Son génome est un ARN positif et le virus, comme le VIH-1, est une cible des APOBEC3. Des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence que A3B, A3C, A3G et A3F étaient capables de restreindre HTLV-1. De la même façon que pour le VIH-1, A3G induit des mutations G vers A sur le brin d'ADN (+) en désaminant les désoxycytidines du brin (-) [Fan et al., 2010], [Mahieux et al., 2005]. Le virus HTLV-1 se multiplie par expansion clonale et ces mutations, dont certaines sont des mutations non-sens, sont stabilisées et amplifiées par mitose. Bien que le virus ne code pour aucune protéine analogue à Vif, la fréquence de mutations G vers A est faible, probablement à cause du mode de réplication par expansion clonale (à la différence du VIH qui produit un nouvel ADN (-) à chaque cycle). Ce phénotype a été associé à la capacité de la nucléocapside d'HTLV-1 à limiter l'encapsidation d'A3G [Derse et al., 2007].

Le virus Foamy, un autre *Retroviridae* de la famille des *Spumavirus* qui est très répandu chez les primates non-humains et qui peut être transmis à l'homme de façon zoonotique. De la même façon que pour le VIH-1 ou HTLV-1, A3G et A3F sont capables de cibler le génome du SFV (Simian Foamy Virus) *in vitro*, générant des mutations de G vers A sur le brin positif [Delebecque et al., 2006]. SFV code pour une protéine auxiliaire, Bet, qui est capable de limiter l'action d'A3G. Contrairement à Vif qui entraîne la dégradation des A3, Bet agirait plutôt en inhibant la dimérisation d'A3G, ce qui diminuerait son encapsidation [Lochelt et al., 2005], [Jaguva Vasudevan et al., 2013].

Une étude *in vivo* dans des souris modifiées génétiquement pour exprimer seulement A3A et A3G humaines a confirmé le phénotype antirétroviral et les modes d'actions différents observés *in vitro*. L'utilisation d'un vecteur MLV a permis de montrer qu'A3G est incorporée dans la particule virale tandis qu'A3A a un effet sur les phases précoces dans la cellule cible [Stavrou et al., 2014]. Cela étaye l'hypothèse que le mécanisme antiviral d'A3A est différent de celui observé pour les autres protéines de la famille (dont A3G est le modèle).

b) Inhibition des virus à ADN

Le génome des virus à ADN peut être sous forme double brin ou simple brin. Lors de la réplication, ces virus migrent dans le noyau, où leur matériel génétique est sous forme simple brin lors des étapes de réplication et de transcription. Il est alors accessible aux A3 et c'est à ce moment-là que s'opère

la restriction. Parmi les virus à ADN inhibés par les A3 humaines, VHB, VPH, HSV et EBV sont des virus à ADN double brin, tandis qu'AAV est le seul virus à ADN simple brin (pour revue, voir [Willems and Gillet, 2015]).

Le virus de l'hépatite B est à l'origine des maladies hépatiques virales. Dans le monde, 2 milliards de personnes ont été en contact avec le virus de l'hépatite B, environ 350 millions de personnes vivent avec une hépatite chronique et 600 000 en meurent chaque année (source ANRS). 90 % des infections aboutissent à une guérison spontanée, mais dans les 10 % restant, l'infection par le virus entraîne des hépatites chroniques, susceptibles d'évoluer à terme vers une cirrhose ou des carcinomes hépatocellulaires.

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* et possède un génome ADN circulaire, partiellement double brin, d'environ 3,2 kb. Cette particularité de son ADN génomique rend ce virus susceptible à l'édition par les APOBEC3 : à l'exception d'A3D/E, toutes les A3 sont capables d'éditer le génome du VHB *in vitro*, A3A étant l'enzyme la plus efficace. Les brins (+) et (-) sont susceptibles d'être édités par les A3, ce qui rend la signature mutationnelle plus difficile à appréhender [Suspène et al., 2005], [Henry et al., 2009], [Vartanian et al., 2010], [Beggel et al., 2013].

Le cycle viral du VHB (cf figure 1.33) commence avec l'entrée du virus dans la cellule via le récepteur NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide), suivi par la décapsidation et le transport nucléaire de l'ADN rc (relaxed circular). La synthèse du brin d'ADN (-) est terminée, afin de convertir l'ADN rc partiellement double brin en ADN en anneau fermé (ADNccc) [Tong and Revill, 2016]. Cet ADN est traduit en ARNm et en ARN pré-génomique (ARNpg). Cet ARNpg est exporté dans le cytoplasme où il est rétrotranscrit en ADN circulaire partiellement double brin (ADN rc) par une ADN polymérase ARN-dépendante virale. La matrice ARN est dégradée par l'activité RNase H de la polymérase. C'est cette forme de matériel génétique viral qui sera encapsidée (cf figure 1.33 A.).

Dans le noyau, A3A et A3B désaminent l'ADN ccc simple brin [Henry et al., 2009]. Puisque les A3 ont besoin d'un substrat ADN simple brin, il a été prédit que l'ADN ccc se dissocie pendant la transcription. La désamination des désoxycytidines opérée par les A3 conduit à des mutations délétères du génome viral et entraîne également sa dégradation par les machineries de réparation de l'ADN, via la voie des ADN glycosylases [Lucifora et al., 2014].

Lors de la synthèse de l'ADN rc dans le cytoplasme, la dégradation de l'ARN pg par la polymérase expose un ADN simple brin. Il peut alors être la cible des A3 cytoplasmiques (A3C, A3F, A3G et A3H) et sa désamination est proportionnelle à son exposition aux A3 (cf figure 1.33 B.) [Beggel et al., 2013]. Ainsi, les portions du génome qui sont double brin sont relativement protégées par rapport à celles qui restent simple brin dans le virion.

Les Herpesvirus, comme le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) ont un ADN génomique double-brin linéaire qui est édité par les A3 sur les deux brins [Suspène et al.,

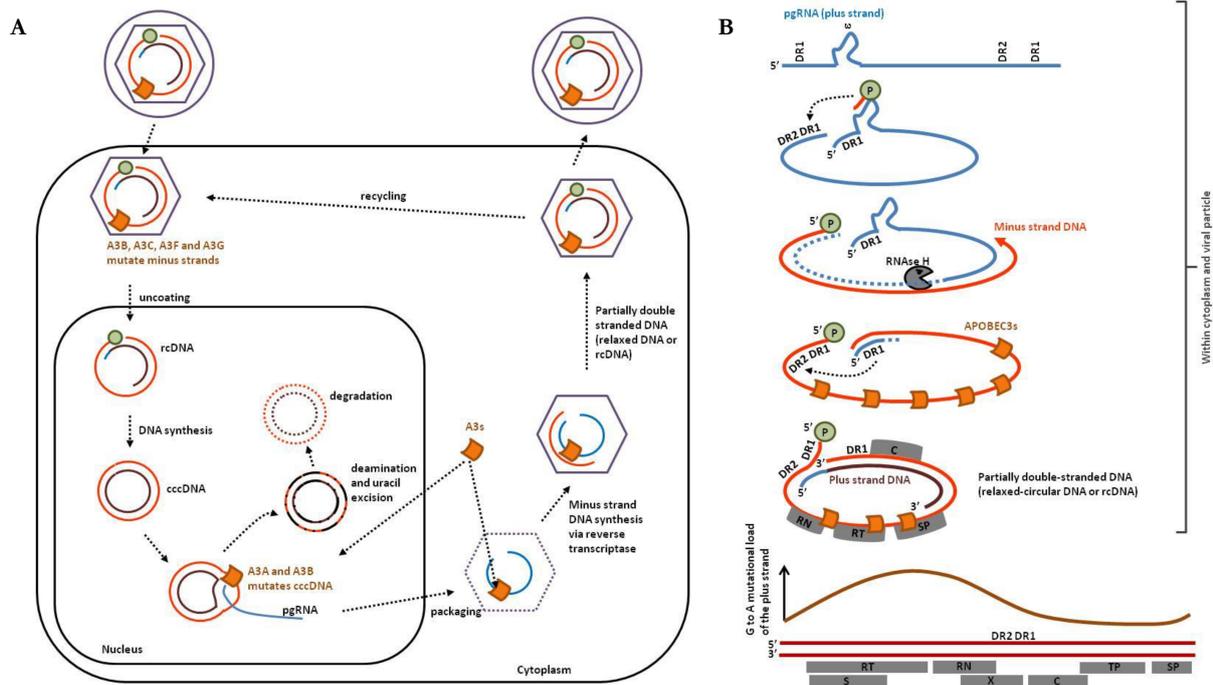


FIGURE 1.33 – A. Cycle de répllication du virus de l'hépatite B. B. Mécanisme de restriction du VHB par les APOBEC3 [Willems and Gillet, 2015].

2011b]. Le virus HSV-1 a un tropisme cellulaire très large, tandis qu'EBV infecte principalement les lymphocytes B et les cellules épithéliales. Après entrée du core viral dans la cellule, la capside est transportée jusqu'aux pores nucléaires où elle délivre l'ADN double brin dans le noyau. Après circularisation du génome viral, une synthèse d'ADN bidirectionnelle est initiée au niveau des origines de répllication. Ce processus requiert la dénaturation de l'ADN et génère ainsi de l'ADN simple brin [Weller and Coen, 2012]. Les A3 nucléaires ont alors accès à leur substrat préférentiel lors des étapes de synthèse de l'ADN et de transcription. *In vitro*, A3A, A3C et A3G peuvent éditer le génome d'HSV-1 et d'EBV, mais seule A3C est capable d'inhiber efficacement la répllication de ces virus. L'analyse d'ADN issu de prélèvements de lésions buccales a permis de confirmer la pertinence de cette restriction *in vivo*, puisqu'on y retrouve des mutations dont la signature correspond aux A3 [Suspène et al., 2011b]. L'édition observée est plus importante sur le brin (-) que sur le brin (+) et une hypothèse possible est liée à la répllication discontinue, où le brin retardé est plus exposé. Le virus possède également une glycosylase à ADN (UDG) capable d'exciser les uridines incorporées par erreur. En action conjointe avec des endonucléases et ligases cellulaires, ce mécanisme de réparation par excision de base pourrait contribuer à protéger le virus de l'édition par les A3 [Bogani et al., 2010].

Les Papillomavirus humains (VPH) sont des virus à ADN circulaire double brin d'une taille de 8 kb. Il existe 200 génotypes différents de papillomavirus, parmi lesquels 24 sont associés à des cancers (dont VPH 16 et VPH 18 en particulier). Parmi les cancers les plus répandus, 100 % des cancers du col

de l'utérus, 90 % des cancers de l'anus et 12 % des carcinomes des voies aérodigestives supérieures sont dus à une infection par un VPH [Parkin and Bray, 2006]. Les virus ont un tropisme pour les épithélia cutané ou muqueux et ce tropisme est dicté par le niveau d'expression virale plus que par l'entrée dans les cellules [Day and Schelhaas, 2014]. Le VPH infecte les cellules de la couche basale de l'épithélium. Après l'entrée du virus dans la cellule cible via le protéoglycane héparane sulfate (HSPG), une première phase d'amplification du génome a lieu avant que celui-ci soit maintenu sous forme d'épisome viral à un faible nombre de copies dans les cellules infectées (cellules basales de l'épithélium stratifié, en division). Le nombre de copies d'ADN viral est maintenu à un faible niveau dans les cellules basales en division, tandis qu'il y a une forte amplification du nombre de copies d'ADN, ainsi qu'une production de virions dans les cellules différenciées de l'épithélium [Pyeon et al., 2009].

Les protéines A3A, A3B et A3H humaines sont exprimées dans les kératinocytes, ce qui a conduit à postuler qu'elles pourraient être des facteurs de restriction des VPH. En 2008, une étude menée par l'équipe du professeur Wain-Hobson sur des biopsies de verrues plantaires et lésions précancéreuses du col de l'utérus met en évidence une édition de l'ADN du VPH1a et VPH16 par les APOBEC3, en particulier A3A, A3C et A3H [Vartanian et al., 2008]. Par la suite, plusieurs études ont confirmé le rôle anti-VPH des APOBEC3. L'IFN- β , capable d'inhiber la réplication du VPH dans les kératinocytes, induit l'expression des sept membres de la famille des A3. La surexpression d'A3A et A3G est associée à une hypermutation de VPH16, notamment au niveau de son gène E2 [Wang et al., 2014]. Une forte surexpression d'A3A et A3B a également été retrouvée dans des cancers associés à VPH et des résultats obtenus *in vitro* ont confirmé le rôle d'A3A dans la restriction du VPH 16 [Ahasan et al., 2015]. Cette restriction est dépendante de l'activité catalytique d'A3A et de la présence de génomes viraux dans les pseudoparticules virales formées [Warren et al., 2015]. Le mécanisme par lequel A3A agit sur les génomes du VPH n'est pas connu, certaines équipes proposant qu'A3A diminue la quantité d'ADN viral encapsidé, tandis que d'autres ne voient pas de différence dans le matériel génétique encapsidé [Ahasan et al., 2015], [Warren et al., 2015]. De la même façon, le rôle d'A3C est controversé et il a été proposé que l'inhibition du VPH16 soit médiée par une interaction entre A3C et la capsid virale [Ahasan et al., 2015].

Le Virus Adéno-Associé (AAV) fait partie de la famille des *Parvoviridae* et son génome est un ADN linéaire simple brin d'environ 4,5 kb. C'est un dépendovirus, qui a besoin qu'un autre virus (en général un adénovirus ou un herpesvirus) infecte la même cellule pour pouvoir mener à bien sa réplication et la production de nouvelles particules virales. La réplication a lieu dans le noyau, via un intermédiaire simple brin. De part la nature de ce génome, le virus AAV est une cible de prédilection pour les APOBEC3 et une activité anti-AAV d'A3A a été démontrée en 2006 [Chen et al., 2006]. La protéine colocalise avec les génomes viraux dans le noyau, ce qui lui permet d'interagir avec le génome viral. L'hypothèse selon laquelle l'activité antivirale d'A3A est nécessaire à l'inhibition d'AAV a été

remise en question car un mutant catalytiquement inactif (F75L) est toujours capable de restreindre AAV. Seule la présence d'un site actif intact, mais pas l'activité cytidine désaminase, est nécessaire pour observer une restriction du virus AAV par A3A [Narvaiza et al., 2009], [Wang et al., 2016].

Les APOBEC3 inhibent donc une grande variété d'éléments pouvant menacer l'intégrité du génome : des virus à ADN, des virus à ARN (dont les rétrovirus) et des rétroéléments endogènes. Ce rôle de facteurs de restriction confirme l'importance des A3 *in vivo* et soulève la question de leur activité en dehors de ce contexte immunitaire inné.

C. Implication des cytidines désaminases dans les cancers

L'activité mutagène des membres de la famille des APOBEC est à double tranchant. D'un côté, elle permet une modulation de l'information génétique et la défense de l'hôte via plusieurs mécanismes biologiques, mais quand elle est dérégulée, elle peut se retourner contre le génome. Ainsi, des essais de surexpression artificiels ainsi que des dérèglements naturels de l'activité ont été liés au développement et à l'évolution de cancers, comme laissait présager leur importante activité mutagène endogène [Roberts and Gordenin, 2014], [Henderson and Fenton, 2015], [Swanton et al., 2015].

C.1. Régulation de l'activité des APOBEC3

Certaines protéines de la famille des APOBEC3 sont capables de former des oligomères : A3B, A3D, A3F, A3G et A3H. La multimérisation de ces protéines est liée à l'activité anti-VIH et à l'encapsidation dans les particules virales [Li et al., 2014]. La forme inactive d'A3G est comprise dans un complexe de fort poids moléculaire, qui peut être transformé en complexe actif de faible poids moléculaire *in vitro* [Wedekind et al., 2006]. Le passage d'une forme à l'autre peut être régulé par les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 dans les lymphocytes [Stopak et al., 2007]. La forme de faible poids moléculaire est responsable d'une restriction du VIH via l'activité cytidine désaminase, tandis que la forme de haut poids moléculaire inhibe le VIH d'une façon indépendante de cette activité catalytique [Aydin et al., 2014]. On a donc un premier niveau de régulation des A3 par la multimérisation.

Sur les sept protéines de la famille des A3, seules A3A, A3C et A3H ont une localisation nucléocytoplasmique [Muckenfuss et al., 2006]. A3G est piégée dans le cytoplasme grâce à un fort signal de rétention cytoplasmique (CRS) et à l'absence de NLS caractérisé [Bennett et al., 2008]. 16 acides aminés (113-128) contenus dans une région adjacente au premier motif ZDD sont responsables de cette différence de localisation. Il est intéressant de noter que cette propriété est indépendante de la capacité d'A3G à se lier à l'ARN.

L'étude du comportement d'A3A lors de la mitose a permis de préciser un peu les déterminants de la localisation cellulaire. Ainsi, les trois cytidines désaminases à un seul domaine CDA A3A, A3C et A3H ont toujours une localisation dans toute la cellule mais sont exclues des chromosomes condensés.

A3B, A3D, A3F et A3G sont exclues du noyau avant la mitose, mais A3B est capable de rester dans le noyau après la mitose. La localisation semble être une combinaison de la taille (23 kDa contre 50 kDa) qui permet une diffusion ou non à travers les pores nucléaires et de déterminants N-terminaux. Les extrémités N-terminales d'A3F et A3G sont cytoplasmiques comme leurs formes complètes, alors que les N-term d'A3B et A3D colocalisent avec l'ADN lors de la télophase tandis que les formes complètes sont exclues du noyau [Lackey et al., 2013].

A3A, quant à elle, a un comportement différent selon le type cellulaire concerné. Lorsqu'on transfecte l'ADN codant pour A3A dans des cellules HeLa, les deux isoformes de la protéine sont capables d'entrer dans le noyau [Mussil et al., 2013]. De même, lorsqu'on exprime A3A dans des cellules HEK 293T, on retrouve la localisation nucléocytoplasmique communément admise. Cependant, ces résultats sont obtenus dans des lignées qui ne correspondent pas aux cellules où la protéine est naturellement exprimée. Ainsi, l'observation d'A3A en cellules THP-1 (lignée monocyttaire) ou cellules primaires du sang CD14⁺ révèle une expression cytoplasmique [Land et al., 2013].

Ces observations permettent de formuler une première hypothèse pour expliquer la régulation de l'activité d'A3A. Ainsi, la rétention cytoplasmique d'A3A dans les cellules myéloïdes protégerait l'ADN cellulaire, tandis que son passage partiel dans le noyau des cellules non-myéloïdes conduirait à une édition de l'ADN génomique.

C.2. Dérégulation des APOBEC3 et dommages à l'ADN

Les APOBEC3 sont capables d'éditer les ADN génomiques viraux et les ADN mitochondriaux. Les trois enzymes A3A, A3C et A3H, possèdent la capacité d'entrer dans le noyau, ce qui amène la question de l'édition de l'ADN nucléaire. Les gènes *MYC* et *TP53* sont fortement mutés dans les cancers (en particulier leucémies et lymphomes), ce qui en fait de bons candidats à l'édition par les A3. Plus de 70 % des cytidines de ces gènes sont éditées lorsqu'on transfecte A3A dans des cellules HeLa ou HEK 293T [Suspène et al., 2011a]. La présence d'uridine dans l'ADN cellulaire est repérée comme un signal de danger par la cellule et déclenche l'excision de l'uracile par l'ADN-glycosylase UNG2 (comme lors de l'élimination des ADN cytoplasmiques mitochondriaux ou étrangers). Le clivage du site abasique par les endonucléases de la voie de réparation BER (Base Excision Repair) peut conduire à une réparation de la cassure ou à une dégradation de l'ADN. UNG2 élimine les sites éditées par A3A : lorsqu'on bloque l'action d'UNG2 par un inhibiteur protéique (UGI), on peut détecter un plus grand nombre de sites éditées (de ~1% à 70 %) [Suspène et al., 2011a].

Lorsqu'un trop grand nombre de cassures simple brin s'accumulent, des cassures double-brin (notées DSB = Double Strand Breaks) finissent par se former. Celles-ci sont reconnues par la machinerie cellulaire DDR (DNA damage response) qui active une cascade de signalisation conduisant à une amplification du signal (pour revue, voir [Ciccia and Elledge, 2010]). Le début de la cascade de signalisation

pour les cassures double brin est la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX [Rogakou et al., 1998]. Le variant H2AX représente 2 à 10 % de la famille des histones dans les tissus de mammifères et la phosphorylation a lieu en γ de la sérine. Cette réponse est extrêmement rapide, puisqu'elle intervient dans les 10 minutes après induction de cassures double brin par irradiation, et elle est très sensible puisqu'une cassure double brin est responsable de la phosphorylation de 2×10^6 paires de bases autour du site de cassure [Rogakou et al., 1998].

L'expression d'A3A dans des cellules U2OS (ostéosarcome humain) conduit à l'activation de deux marqueurs de dommages à l'ADN, l'histone γ H2AX et la concentration de 53BP1 en foci, un autre marqueur précoce des cassures de l'ADN [Schultz et al., 2000] [Landry et al., 2011], [Mussil et al., 2013]. L'apparition de cassures double brin est liée à l'activité catalytique d'A3A, suivie de l'action d'UNG2 : des mutants catalytiquement inactifs (C106S ou E72Q) n'induisent pas de dommages à l'ADN et la présence de l'inhibiteur UGI annule le signal γ H2AX [Landry et al., 2011], [Mussil et al., 2013].

La capacité d'A3A à éditer le génome cellulaire et induire des cassures double brin est directement liée à sa présence dans le noyau. Ainsi en cellules HEK 293T et HeLa, A3A WT est présente dans le noyau et induit des DSB, tandis qu'un mutant cytoplasmique (possédant un signal d'export nucléaire ou rendu incapable de passer les pores nucléaires par fusion à la β -galactosidase de 116 kDa) perd son caractère génotoxique [Land et al., 2013], [Mussil et al., 2013]. Au contraire, un mutant auquel on a rajouté une étiquette NLS conserve sa capacité à induire des DSB et reste aussi toxique qu'A3A WT. Il est intéressant de noter que les deux isoformes d'A3A exprimées séparément possède une activité cytidine désaminase responsable de la génération de DSB [Mussil et al., 2013].

Étant donné le danger représenté par les A3 pour l'ADN cellulaire, on peut postuler qu'il existe des mécanismes capables de protéger l'intégrité de l'ADN. TRIB3 a été identifiée par un crible double-hybride en levure comme étant capable d'interagir avec A3A et A3C et l'interaction confirmée par copurification à partir de cellules humaines (HeLa et neutrophiles primaires). TRIB3 est exclusivement localisée dans le noyau et sa présence diminue l'édition de l'ADN cellulaire par les A3, ainsi que l'apparition de cassures double brin. De plus, la co-expression de TRB3 et A3A ou A3C s'accompagne d'une diminution de la quantité de ces A3 [Aynaud et al., 2012]. Tous ces indices pointent vers un rôle régulateur de TRB3 pour l'activité d'A3A. Cependant, une autre étude effectuée également en HEK 293T a montré que l'expression de TRB3 ne changeait ni la localisation, ni le caractère génotoxique d'A3A [Land et al., 2013]. Le rôle physiologique de TRB3 en lien avec A3A reste donc à déterminer.

Les APOBEC3 sont seulement actives sur un substrat ADN simple brin et les mutations génomiques observées peuvent provenir d'une activité cytidine désaminase sur l'ADN transitoirement simple brin. Dans la cellule, l'ADN est exposé sous forme de simple brin pendant plusieurs procédés cellulaires fréquents : la transcription, la recombinaison et la réplication (cf figure 1.34). La réparation des cassures double brin expose également un ADN simple brin. Lors de la réplication, la transcription ou la

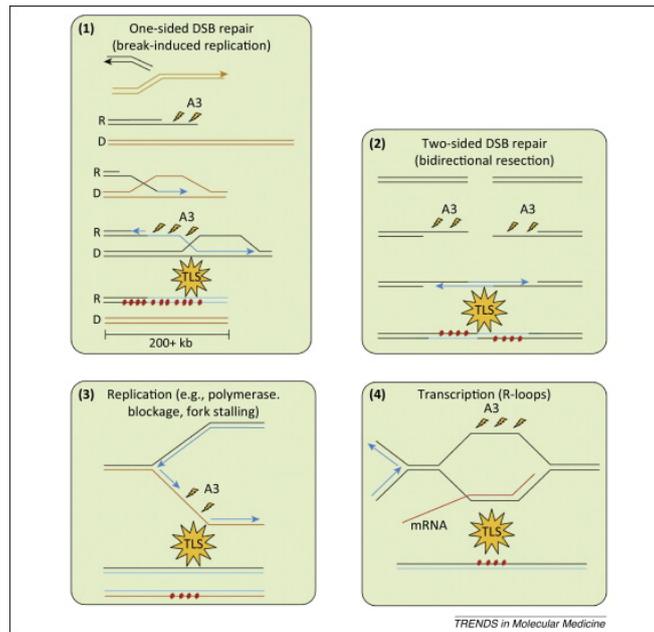


FIGURE 1.34 – L’ADN génomique sous forme simple brin est une cible pour les APOBEC3, adapté de [Henderson and Fenton, 2015]. 1. Réparation des cassures double brin par recombinaison homologue. 2. Réparation des cassures double brin par résection bidirectionnelle. 3. Stress de réplication 4. Transcription

réparation des DSB, les deux brins d’ADN ne sont pas équivalents (pour revue, voir [Haradhvala et al., 2016]). Le brin retardé, dont la synthèse est discontinue reste exposé sous forme simple brin plus longtemps que le brin précoce. Lorsqu’un stress de réplication est imposé aux cellules U2OS, le temps de disponibilité de l’ADN simple brin augmente et cela se traduit par un signal de DSB plus important [Green et al., 2016]. L’analyse de données génomiques issues de cancers associés aux A3 ainsi que des expériences dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de démontrer qu’A3A et A3B désaminent préférentiellement le brin retardé [Hoopes et al., 2016], [Seplyarskiy et al., 2016].

Il a été proposé que l’action d’A3A soit possible uniquement lorsqu’il y a réplication de l’ADN (dans les cellules en division) et que l’absence de réplication dans les cellules quiescentes protège le génome de l’édition par A3A [Green et al., 2016].

Selon ce second modèle, ce n’est plus la localisation cellulaire d’A3A qui régulerait son activité, mais l’accessibilité de son substrat ADN simple brin. Il serait donc intéressant de confronter ces deux modèles pour une meilleure compréhension de la régulation d’A3A.

C.3. Conséquences cellulaires de l'édition et des dommages à l'ADN

a) Dommages à l'ADN et arrêt du cycle cellulaire

Deux grands types de dommages à l'ADN sont les cassures double brin et le stress de réplication. Ils conduisent à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). Cette voie de signalisation repose sur la famille des protéines kinases 3-kinase-like (PIKK), qui comporte ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and RAD-3 related) et DNA-PK(DNA-dependant protein kinase) et sur la famille des poly(ADP-ribose) polymérasés (PARP). La transduction du signal via de nombreux acteurs peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN, à la sénescence de la cellule, à l'apoptose, au contrôle de la transcription et de l'épissage ou à la régulation du métabolisme [Ciccia and Elledge, 2010].

Une des conséquences principales de l'expression d'A3A est un arrêt du cycle cellulaire. En présence de la forme sauvage d'A3A, l'accumulation de cassures double-brin conduit à un arrêt du cycle cellulaire dans des cellules U2OS ou HeLa transfectées avec A3A et HepaRG (cellules hépatiques) stables inductibles pour l'expression d'A3A [Landry et al., 2011]. Des études en U2OS et HepaRG inductibles ou en HeLa transfectées ont permis de préciser la mécanisme responsable de l'arrêt du cycle cellulaire. Plusieurs kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Chk2 et Chk1) sont phosphorylées, suggérant que les voies de signalisation ATM et ATR sont activées [Green et al., 2016], [Mussil et al., 2013]. Après expression d'A3A pendant 24h, le cycle cellulaire est arrêté dans les trois types cellulaires, en phase G1/S pour HepaRG et HeLa et en phase G2/M pour les U2OS. L'observation que la désamination d'A3A et les dommages à l'ADN augmentent pendant la réplication de l'ADN ont conduit à l'hypothèse que des cellules ne se divisant pas seraient moins sensibles à A3A. Cela a été confirmé par l'observation que des cellules U2OS arrêtées présentaient un plus faible signal γ H2AX comparé aux cellules en division [Green et al., 2016].

En conclusion, les conséquences de l'édition de l'ADN génomique par les A3 peuvent être différentes selon le niveau d'édition. Si les sites édités sont nombreux, les mécanismes de réparation vont conduire à une accumulation de cassures double brin dans le génome et déclencher la mort de la cellule par apoptose. En revanche, s'il y a peu de sites édités et qu'ils ne sont pas éliminés par la machinerie cellulaire, le génome accumule les mutations et la cellule peut devenir cancéreuse.

b) Édition des génomes et apparition de cancers

La présence d'A3A dans le noyau conduit à une édition de l'ADN génomique de dC vers dU. Normalement, les dU génomiques résultant de la désamination ou de l'incorporation accidentelle de dUMP durant la réplication sont retirés par UNG et la machinerie BER. Lorsque le remplacement de dU par dC n'a pas lieu avant le prochain cycle de réplication, des mutations apparaissent, dont la nature dépend du moment auquel la réplication a interrompu la réparation et de la polymérase impliquée [Henderson and Fenton, 2015]. Si la réplication a lieu avant le retrait de l'uracile, on observe une transition de C vers T due à l'incorporation d'une adénine dans le brin fille par complémentarité avec l'uracile. Si UNG2 a retiré l'uracile et qu'on a un site abasique, les polymérases TLS (translesion synthesis) sont quand même capables de répliquer l'ADN et insèrent le plus souvent un dA dans le brin fille, ce qui conduit également à une transition C vers T [Waters et al., 2009]. D'autres polymérases comme Rev1 insèrent un dC, conduisant à une transversion C vers G chez la levure [Chan et al., 2013].

Dès le milieu des années 90, un lien entre l'activité des APOBEC et le cancer a été proposé après l'observation que la surexpression d'APOBEC1 chez la souris conduisait à des carcinomes hépatiques [Yamanaka et al., 1995]. L'étude des séquences ADN issues de trois cancers (carcinome des voies aérodigestives supérieures, cancer de la prostate et myélome multiple) ont mis en évidence la présence de clusters de mutations au niveau des bases C :G avec une coordination entre les brins (c'est à dire de longues séries de guanines ou cytosines mutées dans le brin séquencé) [Roberts et al., 2012]. Ces mutations se produisaient souvent au niveau des cassures liées aux réarrangements chromosomiaux (c'est à dire de longues séquences d'ADN simple brin) et étaient enrichies en motifs ciblés par les APOBEC. La même année, une autre étude s'est intéressée aux mutations dans les cancers du sein et a également mis en évidence des clusters de mutations [Nik-Zainal et al., 2012]. Ces clusters étaient caractérisés par les mêmes mutations C :G coordonnées et ont été baptisés *kataegis* (du grec tempête). Les mutations les plus courantes étaient C vers T et C vers G, dans un contexte TpCpW avec W = A ou T, ce qui a conduit à proposer que les A3 TC-spécifique étaient responsables (A3A, A3B, A3C, A3F et A3H). A3B est souvent surexprimée dans les tissus cancéreux comparé aux tissus sains et une étude de 2013 a montré que l'expression d'A3B est corrélée à la quantité de cytosines mutées dans les tumeurs mammaires [Burns et al., 2013a]. De plus, le knock-down d'A3B supprime l'activité enzymatique désoxycytidine désaminase d'extraits nucléaires de lignées cellulaires de cancers du sein. Plus largement, il a été montré qu'A3B est surexprimée et qu'on retrouve des mutations spécifiques de cette enzyme dans de nombreux types de cancers : vessie, col de l'utérus, poumons, sein et cancers des voies aérodigestives supérieures [Roberts et al., 2013], [Burns et al., 2013b]. Le moteur de cette surexpression d'A3B pourrait être l'infection virale, puisque la protéine E6 du VPH est capable de stimuler l'expression d'A3B [Vieira et al., 2014]. On peut noter le paradoxe : la surexpression de protéines A3 liée à l'infection virale a l'avantage de protéger la cellule en mutant le génome viral, mais

des effets délétères de mutations génomiques cellulaires peuvent apparaître. D'autres études ont associé une délétion d'A3B au développement de cancer du sein dans des populations féminines d'ascendance chinoise ou européenne [Long et al., 2013], [Xuan et al., 2013]. Il s'agit d'une délétion de 29,5 kb entre l'exon 5 d'A3A et l'exon 8 d'A3B qui conduit à un ARN chimérique qui contient la séquence complète d'A3A et le 3' UTR d'A3B. Une délétion d'A3A/A3B a également été observée dans des tumeurs du pancréas et dans des carcinomes hépatiques [Liang et al., 2014], [Zhang et al., 2013].

Le rôle d'A3A dans l'induction de cancers a également été proposé. A3A, A3C et A3H sont souvent exprimées dans les kératinocytes infectés par le VPH et ces enzymes éditent le génome viral, ce qui pourrait influencer le développement de tumeurs liées au VPH [Vartanian et al., 2008], [Guan et al., 2012]. Une étude biochimique de l'activité d'A3A a proposé que les mutations CC vers TT observées dans les cancers de la peau soient liées à A3A [Pham et al., 2013]. Étant donné que l'expression d'A3A est corrélée avec un environnement inflammatoire (IFN de type I et II) et qu'une inflammation chronique est souvent associée à la cancérogénèse, il a été proposé que les mutations induites par A3A contribuent à la sélection de mutations somatiques dans plusieurs cancers [Nik-Zainal et al., 2014]. De plus, des hypermutations liées à A3A différentes de celles liées à A3B ont été détectées dans plusieurs cancers humains [Chan et al., 2015]. Enfin, l'ARN chimérique A3A-A3B-3'UTR est exprimé à des niveaux 20 fois plus élevés qu'A3A WT et il est associé à une hyperédition de l'ADN nucléaire [Caval et al., 2014a]. Une hypothèse est que le 3'UTR d'A3A est normalement ciblé par un ou plusieurs microARN qui diminueraient son expression et que cette restriction est levée avec l'ARN chimérique.

Selon les cas, les protéines A3 semblent avoir tantôt un effet protecteur, tantôt un effet délétère pour la cellule et il est probable qu'une régulation de leur activité selon le tissu concerné ou l'état d'inflammation soit impliquée.

D. Hypothèses de travail

APOBEC3A est une cytidine désaminase dont le comportement est complexe et semble dépendre du contexte cellulaire où elle est exprimée. L'expression endogène d'APOBEC3A dans les cellules myéloïdes n'est pas cytotoxique et dans ce contexte, A3A joue un rôle antiviral en hypermutant le génome du VIH-1. Son expression ectopique dans des cellules non myéloïdes est toxique car elle conduit à la formation de cassures double brin et à l'arrêt du cycle cellulaire. Lorsqu'une dérégulation de son expression est observée, cela conduit à une hypermutation du génome cellulaire et est associé au développement de cancers. Il existe actuellement deux modèles concernant la régulation de l'expression d'A3A : l'un propose que la présence ou non d'A3A dans le noyau détermine sa capacité à éditer l'ADN nucléaire, tandis que l'autre propose que la réplication de l'ADN est nécessaire pour qu'A3A puisse éditer le génome. Le comportement d'A3A est surtout étudié dans des cellules non-myéloïdes où on observe une toxicité cellulaire importante et très peu de données permettent d'expliquer l'absence de toxicité observée en cellules myéloïdes. La problématique est donc la suivante : quelles caractéristiques d'A3A permettent d'expliquer son comportement cellulaire complexe ?

Le projet est organisé autour de plusieurs axes :

- L'expression d'APOBEC3A induit-elle une toxicité dans les cellules myéloïdes en division ?
- La localisation cellulaire d'A3A est-elle le déterminant majeur de son activité ?
- Des modifications post-traductionnelles d'A3A ou des partenaires cellulaires sont-ils impliqués dans la régulation de l'activité d'A3A ?
- Quelles sont les conséquences physiologiques de l'activité éditrice d'A3A et des dommages à l'ADN associés ?
- Les deux isoformes d'A3A sont-elles actives et jouent-elles le même rôle dans la cellule ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons défini différents objectifs :

- générer des lignées cellulaires stables permettant l'expression inductible d'A3A dans deux types cellulaires : les cellules HeLa, lignée non-myéloïde et les cellules U937, lignée myéloïde.
- étudier la toxicité d'A3A et sa capacité à induire un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules HeLa (contexte non physiologique) et les cellules U937 (contexte physiologique).
- caractériser la capacité d'A3A à induire des cassures double brin dans ces différents types cellulaires, ainsi que les conséquences cellulaires de ces dommages à l'ADN
- caractériser les mécanismes de régulation de l'activité d'A3A en étudiant sa localisation et en purifiant la protéine
- comparer l'activité cellulaire des deux isoformes d'A3A

À cause de difficultés techniques concernant la purification d'A3A, la réponse à certaines de ces questions n'a pas pu être apportée au cours de cette thèse.

Chapitre 2

Outils expérimentaux

A. Purification de cellules primaires du sang

La méthode de purification des cellules du sang (monocytes et lymphocytes du sang périphérique) est décrite dans un article publié par le laboratoire [Berger et al., 2011c]. En collaboration avec l'Établissement Français du Sang de Lyon, nous obtenons des poches de sang ou des anneaux de cytophèrese de donneurs sains. Dans le cas de poches de sang, le sang est déplaqué puis les cellules mononucléées (PBMC) sont séparées des hématies grâce à leur différence de densité. On utilise pour cela un coussin de milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll [®]), qui permet d'obtenir un anneau de PBMC tandis que les hématies sont culottées au fond du tube. Dans le cas d'un anneau de cytophèrese, les plaquettes ont déjà été retirées et on peut directement faire la séparation des PBMC. Une seconde centrifugation utilisant un coussin de percoll permet, toujours en fonction de la densité, de séparer les monocytes (qui forment un anneau) des lymphocytes (qui sont culottés au fond du tube). La fraction monocyttaire n'étant pas pure, on effectue ensuite une déplétion négative des cellules contaminantes en utilisant des billes magnétiques couplées à CD3, CD7, CD19, CD45RA et CD56 (Miltenyi [®]). On obtient ainsi une fraction monocyttaire de pureté ≥ 95 %.

On peut maintenir les monocytes obtenus en culture dans du milieu RPMI + 5% SVF, ou les différencier en cellules dendritiques ou macrophages. Pour obtenir des cellules dendritiques immatures, les monocytes sont mis en culture dans du milieu RPMI + 5% SVF avec les cytokines IL-4 et GM-CSF à 100 ng/mL (interleukine-4 et granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) pendant 4 jours. Pour différencier les monocytes en macrophages, on les incube 3h sans sérum afin d'induire leur adhérence, puis le sérum ainsi que le GM-CSF sont rajoutés (10 % et 100 ng/mL final respectivement). La différenciation est observée après 4 jours.

B. Lignées cellulaires

Dans l'objectif de comparer le comportement d'APOBEC3A dans des cellules myéloïdes ou non-myéloïdes, nous avons utilisé deux lignées cellulaires.

Les cellules HeLa sont des cellules humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM + 10% de SVF + pénicilline/streptomycine (100 U). Même après stimulation à l'IFN- α , elles n'expriment pas de quantités détectables d'APOBEC3A par Western Blot.

Les cellules U937 sont des monocytes provenant d'une effusion pleurale d'un patient atteint de lymphome histiocytaire. Elles sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI + 10% SVF + pénicilline/streptomycine (100 U) + Heps 10 mM. Ces cellules peuvent être différenciées en cellules adhérentes de type macrophages par traitement à la PMA (Phorbol-12-myristate-13-acétate, 100 ng/mL). Qu'elles soient en division ou différenciées, un traitement à l'IFN- α n'induit pas de quantités détectables d'APOBEC3A dans ces cellules par Western Blot.

C. Plasmides utilisés

Le plasmide pRetro-X-Tight-A3A-3 \times HA-6 \times HIS (permettant l'expression inductible d'A3A) a été construit à partir d'un plasmide A3A-HA déjà présent au laboratoire (donné par le Dr Kenzo Tokunaga, Tokyo, Japon). Les mutants E72Q (catalytiquement inactif), Δ 13 (délétion des 12 premiers acides aminés), M13I (élimination du site interne d'entrée du ribosome) ont été obtenus à partir d'A3A-HA WT et clonés dans pRetro-X-Tight de la même façon. Une construction portant une étiquette NLS à l'extrémité C-terminale (séquence NLS de c-Myc : PAAKRVKLD) a également été obtenue. La liste des amorces utilisées est présentée dans la table 2.1.

D. Établissement de lignées cellulaires inductibles stables

D.1. Production de particules rétrovirales

La toxicité d'APOBEC3A en cellules non myéloïdes ([Land et al., 2013]) impose l'utilisation d'un système inductible pour créer des lignées stables exprimant la protéine. Nous avons utilisé le système pRetroX-Tight et pRetroTetOn de chez Clontech®, qui est basé sur un vecteur rétroviral MLV (Murine Leukemia Virus) [Gossen and Bujard, 1992], [Gossen et al., 1995], [Barton and Medzhitov, 2002]. Le principe de ces vecteurs est basé sur la séparation physique sur 4 plasmides de tous les éléments nécessaires à la formation d'une particule virale (cf figure 2.1).

La première construction contient un minigénome viral et les éléments nécessaires à l'encapsidation du génome ainsi qu'à l'infection des cellules-cibles. Le minigénome est constitué du gène d'intérêt (ici celui d'APOBEC3A avec une double étiquette HA-6xHIS à l'extrémité C-terminale) sous le contrôle d'un promoteur inductible et du gène de résistance à la puromycine sous le contrôle d'un promoteur

deux protéines sont codées sous un même promoteur et séparées par un site interne d'entrée du ribosome (IRES). Cela permet d'assurer qu'une forte proportion de cellules G418-résistantes expriment la protéine transactivatrice. Les deux derniers plasmides codent pour les protéines structurales et enzymes Gag et Pol et pour les glycoprotéines d'enveloppe. Ici, il s'agit de la glycoprotéine VSVg du virus de la stomatite vésiculeuse, utilisée pour sa capacité à entrer dans une grande variété de cellules [Cronin et al., 2005].

La co-transfection au phosphate de calcium de ces quatre vecteurs dans des cellules productrices telles que les HEK 293T permet d'obtenir des vecteurs rétroviraux MLV à cycle d'infection unique. Les virus libérés dans le surnageant cellulaire sont filtrés puis purifiés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose à 25 %. Le titre viral est déterminé par mesure radioactive de l'activité transcriptase inverse (exo-RT).

D.2. Transduction de cellules myéloïdes ou non

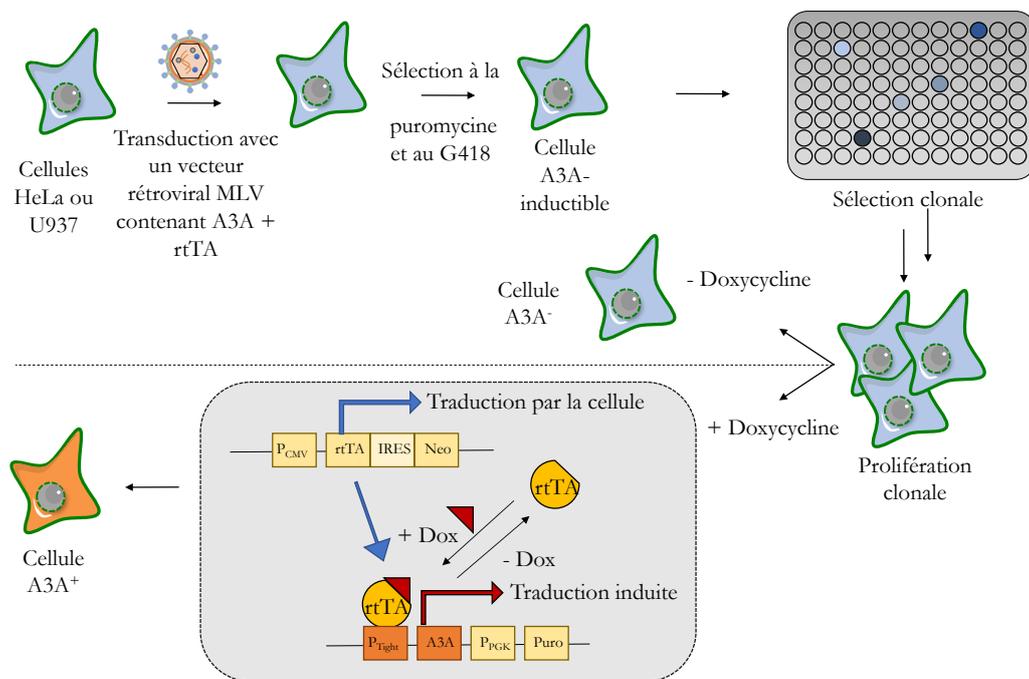


FIGURE 2.2 – **Transduction de cellules HeLa ou U937 pour obtenir des cellules inducibles.** Les cellules sont infectées par les vecteurs rétroviraux MLV, puis après double-sélection antibiotique et sélection clonale, on obtient les cellules inducibles. En présence de doxycycline, le transactivateur rtTA permet l'expression d'APOBEC3A.

Les cellules HeLa ou U937 sont infectées par le vecteur MLV afin d'intégrer les gènes codant pour APOBEC3A et le transactivateur rtTA (cf figure 2.2). Après sélection à la puromycine et au G418 pendant 2 semaines, les cellules sont diluées jusqu'à 0,3 cellule par puits en P96 afin d'isoler des clones.

Les clones sont amplifiés et l'expression d'A3A est vérifiée en ajoutant de la doxycycline. Lorsque la doxycycline est présente, le transactivateur rtTA peut se lier au promoteur P_{Tight} et induire l'expression d'A3A. Au contraire, en l'absence de doxycycline, le transactivateur ne peut se lier au promoteur et aucune expression d'A3A n'est détectée par western blot (voir chapitre 3).

E. Mesure de la prolifération cellulaire

Afin de mesurer la prolifération cellulaire, des cellules (HeLa ou U937) inductibles pour A3A ont été plaquées à une concentration de 10^4 /mL et induites à la doxycycline (respectivement 1 et 0,5 mg/mL). Les cellules ont été comptées tous les jours pendant 7 jours. Au bout de deux et cinq jours de prolifération, les cellules ont été récoltées, marquées à l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD) afin de déterminer la proportion de cellules mortes.

F. Marquage de dommages à l'ADN

Les cellules HeLa inductibles pour A3A ont été plaquées en présence de doxycycline (1 mg/mL) et laissées pendant 36h afin de permettre une bonne expression de la protéine. Les cellules U937 ont été traitées ou non à la PMA pendant 48h afin d'induire la différenciation ou en macrophages, puis elles ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL) pendant 36h après différenciation. Les cellules primaires (monocytes ou cellules dendritiques) ont été traitées à l'IFN- α pendant 24h avant d'être récoltées. Dans tous les cas, un contrôle positif a été réalisé en traitant les cellules concernées avec de l'étoposide 50 μ M. Les cellules traitées ont été récoltées, lavées dans du PBS puis marquées avec un anticorps anti- γ H2AX couplé à un fluorophore Alexa Fluor® 488 (qui reconnaît la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2A.X) de Cell Signaling Technology en utilisant le kit Fix and Perm® de Thermo Fisher Scientific. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD) afin de déterminer la quantité de cassures double brin.

G. Immunofluorescence

Les cellules HeLa et U937 différenciées sont adhérentes et ont été cultivées directement sur les lamelles d'immunofluorescence. L'induction a été faite de la même façon que précédemment (cf partie F.). Les cellules U937 non différenciées ont été déposées après induction sur les lamelles et l'adhérence assurée par la présence de poly-L-lysine (20 μ g/mL). Les cellules ont été fixées à la PFA 4%, puis elles ont été traitées à NH_4Cl avant d'être perméabilisées au PBS 0,5% Triton. Une saturation dans le lait a été suivie de l'incubation dans un anticorps primaire de souris dirigé contre l'étiquette HA (1/200ème), puis dans un anticorps secondaire d'âne dirigé contre la souris, couplé à un fluorophore à 488 nm (1/100ème). Les lamelles d'immunofluorescence ont été analysées par Romain Appourchaux et Aurélien Schwob sur un microscope confocal Zeiss LSM710. L'analyse des images d'immunofluorescence

est faite avec le logiciel ImageJ. Le profil de fluorescence selon la plus grande dimension du noyau est mesuré, puis les données sont compilées et traitées par un programme en PythonTM(cf Annexe). L'analyse de la taille du noyau et des rapports $\frac{N}{N+C}$, $\frac{C}{N+C}$ et $\frac{N-C}{N+C}$ (où N correspond à l'intensité moyenne de fluorescence dans le noyau et C à celle dans le cytoplasme) ont été effectuées sous R. Pour chaque condition, entre 75 et 120 cellules issues de 2 à 6 expériences indépendantes ont analysées. Ces deux analyses ont été faites grâce à l'aide de Mathilde Dumond.

H. Détection de ROS

L'induction a été faite de la même façon que précédemment (cf partie F.). En même temps que l'induction à la doxycycline, les cellules ont été traitées au DPI (diphenyliodonium chloride) 0,5 μ M ou au NAC (N-acétylcystéine) 6 mM. Les cellules ont ensuite été décrochées si nécessaire, comptées et redistribuées dans des tubes de cytométrie en flux (10^5 cellules par tube). Elles ont été incubées 30 minutes en présence de 20 μ M DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) puis certaines ont été traitées pendant 4 heures supplémentaires avec 100 μ M TBHP (tert-butyl hydrogen peroxyde) afin d'induire un contrôle positif. Le DCFDA est désacétylé par des estérases cellulaires, puis les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sécrétées par la cellule ou induites par le TBHP l'oxydant afin d'obtenir un composé fluorescent (495 et 529 nm de maximum d'émission). Les cellules vivantes sont ensuite analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD) pour déterminer la quantité de ROS présentes dans les cellules.

I. Purification d'A3A à partir de cellules HeLa

Des cellules HeLa sont plaquées en boîtes de culture de 10 cm de diamètre (1×10^6 par mL) et induites à la doxycycline pendant 36h. Elles sont récoltées puis lysées dans un tampon CHRIS (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Nonidet P40 0,5 %, 0,2 % SDS, inhibiteur de protéase sans EDTA et inhibiteur de phosphatase, les deux Roche ®). Après sonication et traitement à la DNase pour éliminer l'ADN, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à $13.000 \times g$ pendant 15 minutes. Le lysat cellulaire est ensuite injecté sur une colonne HisTrap de 1mL de GE Healthcare (nickel sur billes de sépharose) via un système de purification de protéines AKTA PURE (GE Healthcare). L'injection se fait pendant 10 minutes en présence d'un tampon de liaison (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazole 5 mM). Le passage de protéines sur la colonne est suivi par mesure de l'absorbance à 280 nm. Après liaison de la protéine d'intérêt à la colonne, celle-ci est lavée avec le tampon de liaison auquel un pourcentage croissant de tampon de lavage (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazole 2M) est ajouté. La protéine est éluée pour une concentration en Imidazole variant entre 100 et 150 mM. Les fractions recueillies contenant la protéine sont ensuite concentrées sur un filtre Amicon Ultra (Millipore) en centrifugeant 45 min à $4000 \times g$. Le lysat concentré obtenu est déposé sur gel d'acrylamide et coloré à l'Instant *Blue*TM pour analyse par spectrométrie de masse.

Chapitre 3

Résultats

A. Établissement de lignées stables exprimant APOBEC3A de façon inductible par la doxycycline

Afin de comparer l'expression d'A3A en cellules myéloïdes et non myéloïdes, nous avons décidé d'établir des lignées stables inductibles à la doxycycline. Les cellules HeLa ont été choisies comme modèle de lignée non-myéloïde et les cellules U937 comme modèle de lignée myéloïde. Un autre modèle de lignée myéloïde sont les cellules THP-1. Cependant, la faible efficacité de transduction que nous avons constaté dans ces cellules n'a pas permis d'obtenir des lignées inductibles stables et nous avons écarté ce modèle.

Deux isoformes d'A3A sont naturellement exprimées dans les cellules myéloïdes primaires (cf figure 3.1 A.). Nous avons donc généré 5 constructions d'A3A (cf figure 3.1 B.) :

- A3A WT : code pour les 2 isoformes à partir d'un seul gène
- A3A Δ 13 : isoforme la plus courte, délétée des 12 premiers acides aminés
- A3A M13I : isoforme la plus longue, où la méthionine en position 13 a été remplacée par une isoleucine
- A3A E72Q : mutant où l'activité cytidine désaminase est inactivée
- A3A NLS : protéine sauvage (les 2 isoformes) avec un signal de localisation nucléaire (NLS) en C-terminal

Les constructions ont une étiquette HA pour une détection plus facile en western blot, et une étiquette HIS pour permettre une purification par affinité sur colonne de nickel (cf partie B.).

Les cellules ont été transduites par un vecteur MLV puis sélectionnées (cf chapitre 2 partie D.). On obtient alors des lignées stables dans lesquelles l'expression d'A3A n'est détectable qu'en présence de doxycycline (cf figure 3.1 C, D et E).

Les U937 présentent l'avantage de se différencier en cellules de type macrophage après induction à la PMA, ce qui permet d'étudier l'influence du cycle cellulaire sur le comportement d'A3A en cellules

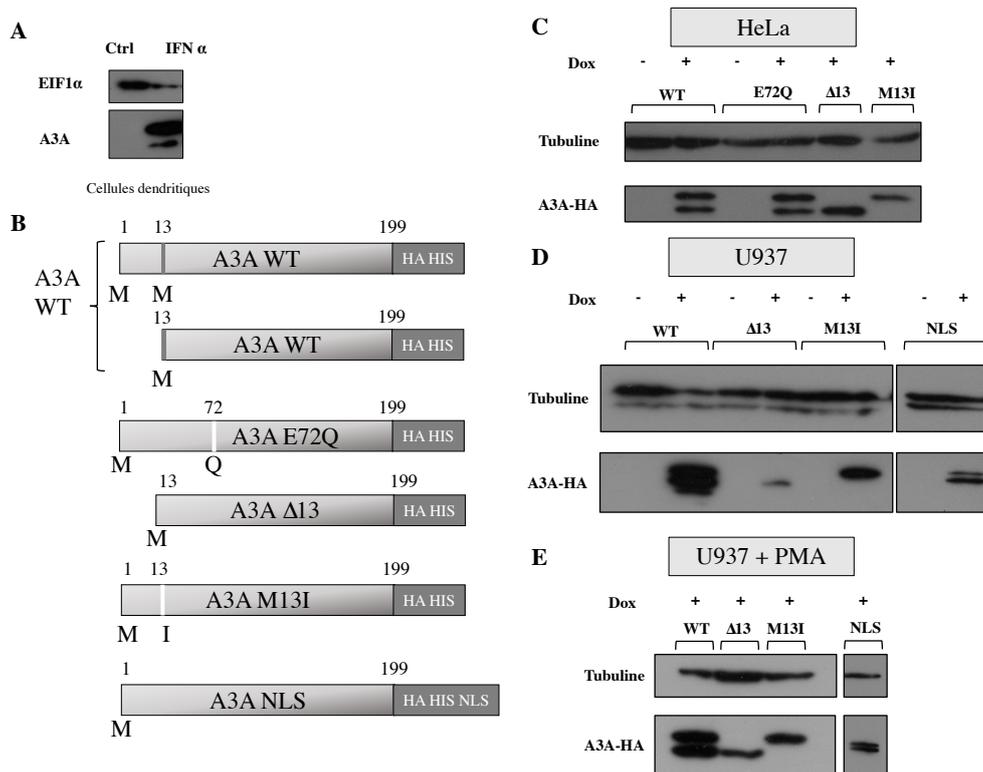


FIGURE 3.1 – **Établissement de lignées cellulaires inductibles pour A3A.** A. A3A est exprimée sous forme de deux isoformes dans les cellules dendritiques primaires traitées à l'IFN- α . B. 5 constructions différentes d'A3A ont été utilisées : WT, E72Q, Δ 13, M13I et NLS. C. Expression inductible des différentes constructions en cellules HeLa traitées par la doxycycline 1mg/mL pendant 36h. D. Expression inductible des différentes constructions en U937 non différenciées traitées par la doxycycline 0,5 mg/mL pendant 36h. E. Expression inductible des différentes constructions en U937 différenciées à la PMA 48h puis traitées par la doxycycline 0,5 mg/mL pendant 36h.

myéloïdes. On notera les lignées inductibles obtenues avec la séquence sauvage d'A3A U937-A3A-WT et HeLa-A3A-WT.

B. Purification d'APOBEC3A à partir de cellules humaines

Dans le but de caractériser les modifications post-traductionnelles d'A3A en cellules HeLa ou U937, nous avons rajouté une étiquette 6 \times His à l'extrémité C-terminale de la protéine. On peut alors purifier la protéine par affinité sur une colonne ou des billes de nickel (NiNTA). Nous avons mis au point une nouvelle méthode de purification qui permet d'obtenir A3A en quantité suffisante pour effectuer une analyse par spectrométrie de masse. La protéine est exprimée dans des cellules HeLa, à des niveaux d'expression comparables à ceux observés *in vivo* (données non présentées).

Nous avons optimisé l'étape de lyse afin d'avoir une solubilisation maximale de la protéine. Les

premiers tests de purification sur billes de Ni manquaient de sélectivité : un grand nombre de contaminants non-spécifiques s'associaient aux billes en même temps qu'A3A. Nous avons alors effectué des tests d'affinité pour les billes de nickel afin de définir les meilleures conditions pour la liaison aux billes, le lavage et l'élution (cf figure 3.2). Le cycle de l'histidine est un cycle imidazole et l'ajout d'imidazole libre dans le milieu génère une compétition pour l'accrochage au nickel. C'est cette compétition qui permet de moduler la liaison aux billes, le lavage et l'élution.

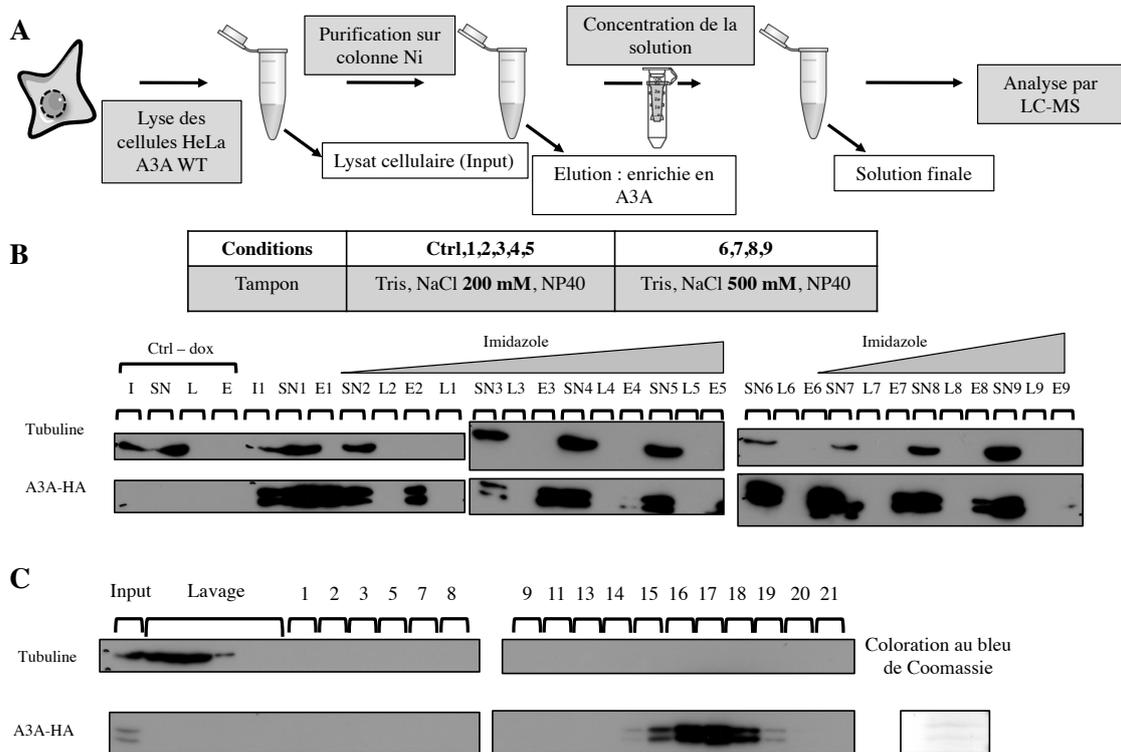


FIGURE 3.2 – Mise au point de la purification sur colonne au nickel d'A3A produite en cellules humaines. A. Schéma de la purification : le lysat cellulaire est purifié sur colonne de nickel avant d'être concentré et analysé par spectrométrie de masse. B. Détermination des conditions optimales de liaison, lavage et élution : concentration en NaCl de 200 mM ou 500 mM et concentration en imidazole de 0 mM (1 et 6), 5 mM (2 et 7), 10 mM (3 et 8), 25 mM (4 et 9) et 50 mM (5). I = Input, SN = Supernatant, L = Lavage, E = Elution. C. Obtention d'une fraction enrichie en A3A et détection par western blot ou coloration au bleu de Coomassie

Une fois ces conditions obtenues, nous avons décidé d'utiliser un système de chromatographie rapide de protéines en phase liquide (FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography) afin de pouvoir travailler avec de grandes quantités de lysat cellulaire. Les cellules (environ $2,5 \times 10^8$) sont récoltées et traitées dans le tampon de lyse avant d'être injectées sur la colonne (cf chapitre 2 partie I.). La lecture de l'absorbance à 280 nm permet de constater que plusieurs protéines s'accrochent à la colonne en plus d'A3A. Ainsi, on observe généralement une première élution avec 30 mM d'imidazole, d'une

fraction qui ne contient pas de niveaux détectables d'A3A. Un lavage prolongé à cette concentration permet d'éliminer une partie des protéines co-purifiées avec A3A. Lorsqu'A3A est éluée, pour une concentration en imidazole aux alentours de 100 à 150 mM, la protéine est détectable en Western Blot. La concentration d'un facteur 100 permet la détection d'A3A par coloration au bleu de Coomassie et une analyse par spectrométrie de masse a pu être effectuée. On retrouve bien les deux isoformes caractéristiques d'A3A dans la fraction concernée.

La méthode que nous avons développée présente des avantages par rapport aux méthodes traditionnelles : la protéine est produite dans des cellules humaines (et non des bactéries) et exprimée à des niveaux physiologiques. Il existe encore un certain nombre de limitations pour pouvoir exploiter cette méthode. La quantité de protéine purifiée n'était pas toujours suffisante pour une analyse par spectrométrie de masse. De plus, la co-purification de protéines partenaires serait difficile étant données les concentrations en sel et en imidazole utilisées sur la colonne.

Malgré ces limites, la méthode pourra être utilisée pour étudier les modifications post-traductionnelles de la protéine dans les différentes lignées mises au point au cours de cette thèse.

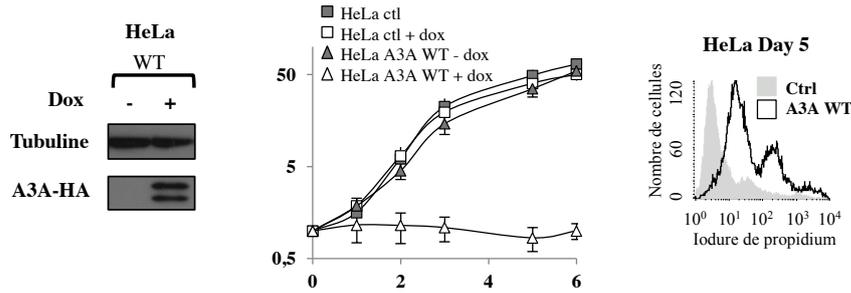
C. APOBEC3A conduit à l'arrêt du cycle cellulaire

Afin de déterminer le phénotype lié à l'expression d'A3A en cellules myéloïdes ou non, les cellules HeLa et U937 inductibles ont été stimulées à la doxycycline, puis leur prolifération a été suivie en comptant le nombre total de cellules pendant 7 jours. En cellules HeLa, conformément à la littérature, la présence d'A3A est associée à un arrêt de la prolifération cellulaire qu'on observe dès deux jours après l'induction (cf figure 3.3 A). Cependant, le même arrêt de prolifération est observé en cellules U937 malgré leur caractère myéloïde (cf figure 3.3 B). Un marquage à l'iodure de propidium a été réalisé 5 jours après l'induction par la doxycycline et révèle une mortalité cellulaire élevée en présence d'APOBEC3A dans les deux types cellulaires. Lorsqu'on s'intéresse à des cellules U937 différenciées à la PMA, on n'observe aucune mortalité cellulaire cinq jours après induction d'A3A (cf figure 3.3 B). Ce n'est donc pas le caractère myéloïde des U937 traitées à la PMA qui les protège de l'action d'A3A, mais seulement leur statut différencié.

D. APOBEC3A induit des dommages à l'ADN dans les cellules en division

Pour caractériser le mécanisme par lequel A3A induit l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules, nous avons regardé les dommages à l'ADN. L'activité catalytique d'A3A conduit à la désamination des cytidines et à l'apparition d'uraciles dans l'ADN génomique de la cellule (cf figure 3.4 A). Ces uraciles anormalement incorporés sont retirés par UNG2, puis les sites abasiques sont clivés par une endonucléase cellulaire. Les cassures double brin qui en résultent sont caractérisées par la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone γ H2AX. Nous nous sommes donc intéressés au marquage

A Prolifération et mort cellulaire en cellules HeLa exprimant A3A WT



B Prolifération et mort cellulaire en cellules U937 traitées ou non à la PMA et exprimant A3A WT

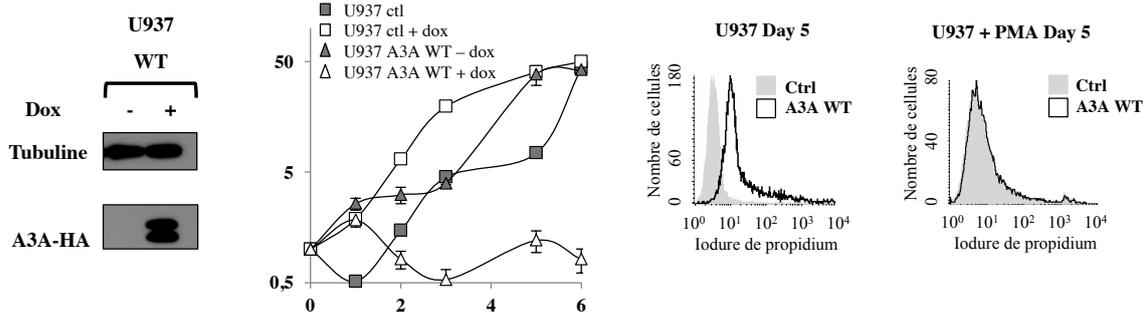


FIGURE 3.3 – L’induction d’A3A dans les cellules en division conduit à un arrêt de prolifération et à une mortalité cellulaire élevée. A. Des cellules HeLa WT ou inductibles pour l’expression d’A3A ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL) et leur prolifération suivie pendant 7 jours. Un marquage à l’iodure de propidium a permis de déterminer la proportion de cellules mortes. B. Des cellules U937 en division ou différenciées à la PMA ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL) et la prolifération des cellules en division suivie pendant 7 jours. Un marquage à l’iodure de propidium a permis de déterminer la proportion de cellules mortes dans les deux cas.

des cassures double brin dans les cellules HeLa et U937, par un anticorps fluorescent spécifique de cette modification de l’histone H2AX.

Dans les cellules HeLa et dans les cellules U937 en division, l’expression d’A3A s’accompagne d’un fort signal γ H2AX, traduisant la présence de cassures double brin. En revanche, les cellules différenciées ne présentent pas de cassures double brin (cf figure 3.4 B). Nous avons alors décidé de regarder si A3A endogène en cellules myéloïdes primaires était capable d’induire des cassures double brin en monocytes ou en cellules dendritiques.

Des monocytes primaires et des cellules dendritiques dérivées des monocytes ont été traités à l’IFN α pendant 24h, puis l’induction de cassures double brin a été mesurée dans ces cellules. Bien qu’A3A soit fortement surexprimée dans ces deux types cellulaires après stimulation à l’IFN α (cf figure 3.5 B), aucun signal γ H2AX n’est détecté dans les cellules (cf figure 3.5 A).

L’expression endogène d’A3A n’est donc pas néfaste pour les cellules myéloïdes primaires testées.

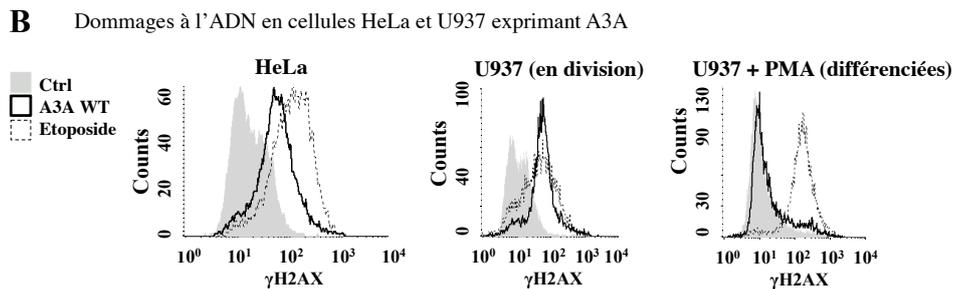
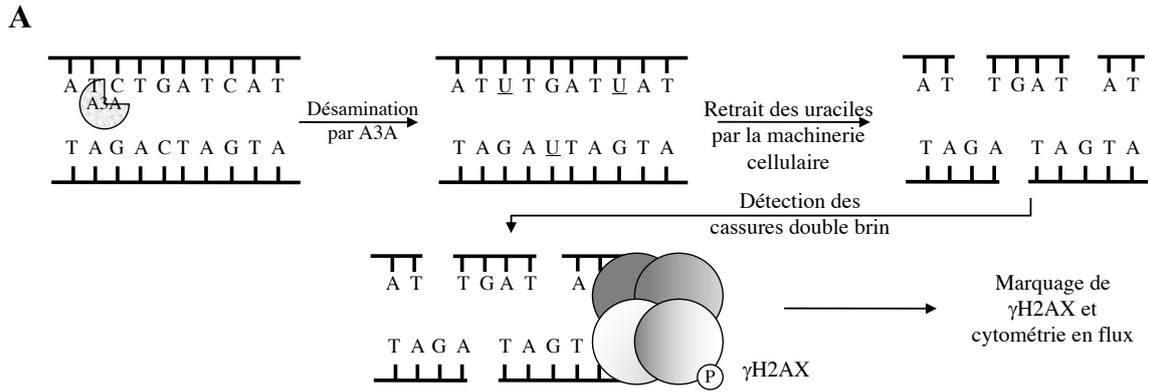


FIGURE 3.4 – L'induction d'A3A dans les cellules en division conduit à des cassures double brin. A. A3A désamine les cytidines de l'ADN nucléaire simple brin. Les uraciles sont retirées par la machinerie de réparation de l'ADN, conduisant à des cassures double brin. La signalisation de ces cassures passe par la phosphorylation de l'histone H2AX, qui est détectable par un anticorps couplé à un fluorophore. B. Des cellules HeLa, U937 en division ou U937 différenciées à la PMA ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL). 48h après induction, un marquage des cassures double-brin est effectué et les cellules sont analysées par cytométrie en flux. L'étoposide (50 μ M) est utilisée comme contrôle positif.

Les résultats obtenus dans les cellules primaires et dans la lignée U937 indiquent qu'A3A n'est toxique que dans les cellules en division, qu'elles soient myéloïdes ou non. C'est le fait que la cellule se divise ou non qui va déterminer la potentielle toxicité d'A3A et non son appartenance à la lignée myéloïde. Une étude de l'équipe du professeur Harris a montré qu'A3A endogène était cytoplasmique et que la localisation en HEK 293T était corrélée à la toxicité [Land et al., 2013].

Nous nous sommes alors intéressés à la localisation subcellulaire d'A3A dans les cellules myéloïdes différenciées ou non, afin de savoir si cela expliquait la différence de génotoxicité.

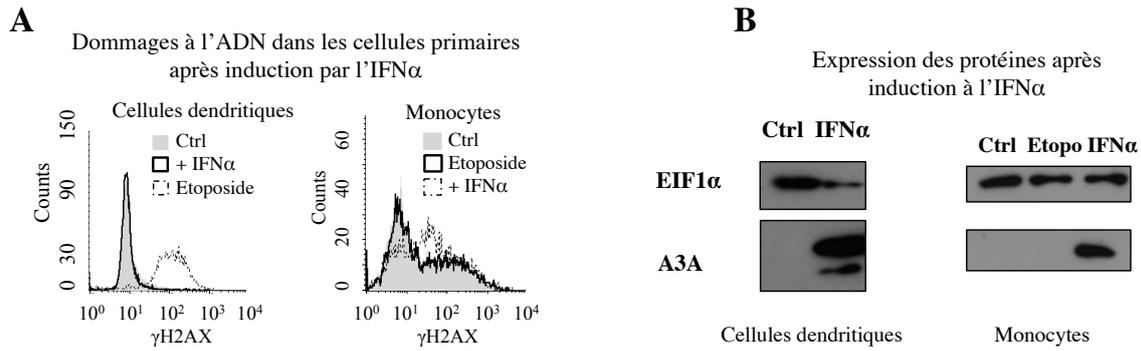


FIGURE 3.5 – L'induction d'A3A par l'IFN α dans les cellules dendritiques ou monocytes primaires ne s'accompagne pas de cassures double brin. A. Des cellules dendritiques et des monocytes primaires humains ont été stimulés à l'IFN α pendant 24h, puis un marquage des cassures double-brin est effectué et les cellules sont analysées par cytométrie en flux. L'étoposide (50 μ M) est utilisée comme contrôle positif. B. L'expression d'A3A endogène est très fortement stimulée en cellules myéloïdes primaires après traitement à l'IFN α .

E. La localisation cellulaire d'APOBEC3A est modulée selon l'état de différenciation de la cellule

Pour connaître la localisation d'A3A dans nos modèles cellulaires, nous avons induit à la doxycycline les lignées cellulaires HeLa et U937 traitées ou non à la PMA. Après 48h d'induction, nous avons réalisé un marquage d'immunofluorescence d'APOBEC3A-HA et du noyau.

Dans les cellules HeLa, on constate une forte expression d'A3A dans toute la cellule (cytoplasme et noyau, cf figure 3.6 A). Les cellules sont également beaucoup plus grosses, ce qui peut être une conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire [Tahara et al., 2013].

Dans les cellules U937 en division, on retrouve également A3A dans le cytoplasme et le noyau en quantité similaire (cf figure 3.6 B). De façon intéressante, la localisation d'A3A semble différente dans les cellules myéloïdes différenciées : alors qu'une forte quantité est toujours présente dans le cytoplasme, il apparaît que la quantité d'A3A présente dans le noyau des cellules différenciées est fortement diminuée (cf figure 3.6 C).

Les cellules en division traitées par A3A sont plus grosses à l'observation. Une mesure de la taille moyenne du noyau de ces cellules a permis de montrer que le noyau des cellules induites pour A3A est significativement plus gros (cf figure 3.7). La taille moyenne du noyau des cellules HeLa passe de 15,3 μ m à 20,9 μ m ($p < 0,001$), tandis que pour les U937 en division (-PMA), on passe de 10,2 μ m à 12,3 μ m ($p < 0,001$). La taille du noyau des U937 traitées à la PMA ne change pas significativement de taille (10,8 à 10,4 μ m après addition de doxycycline). En présence d'A3A, la morphologie du noyau

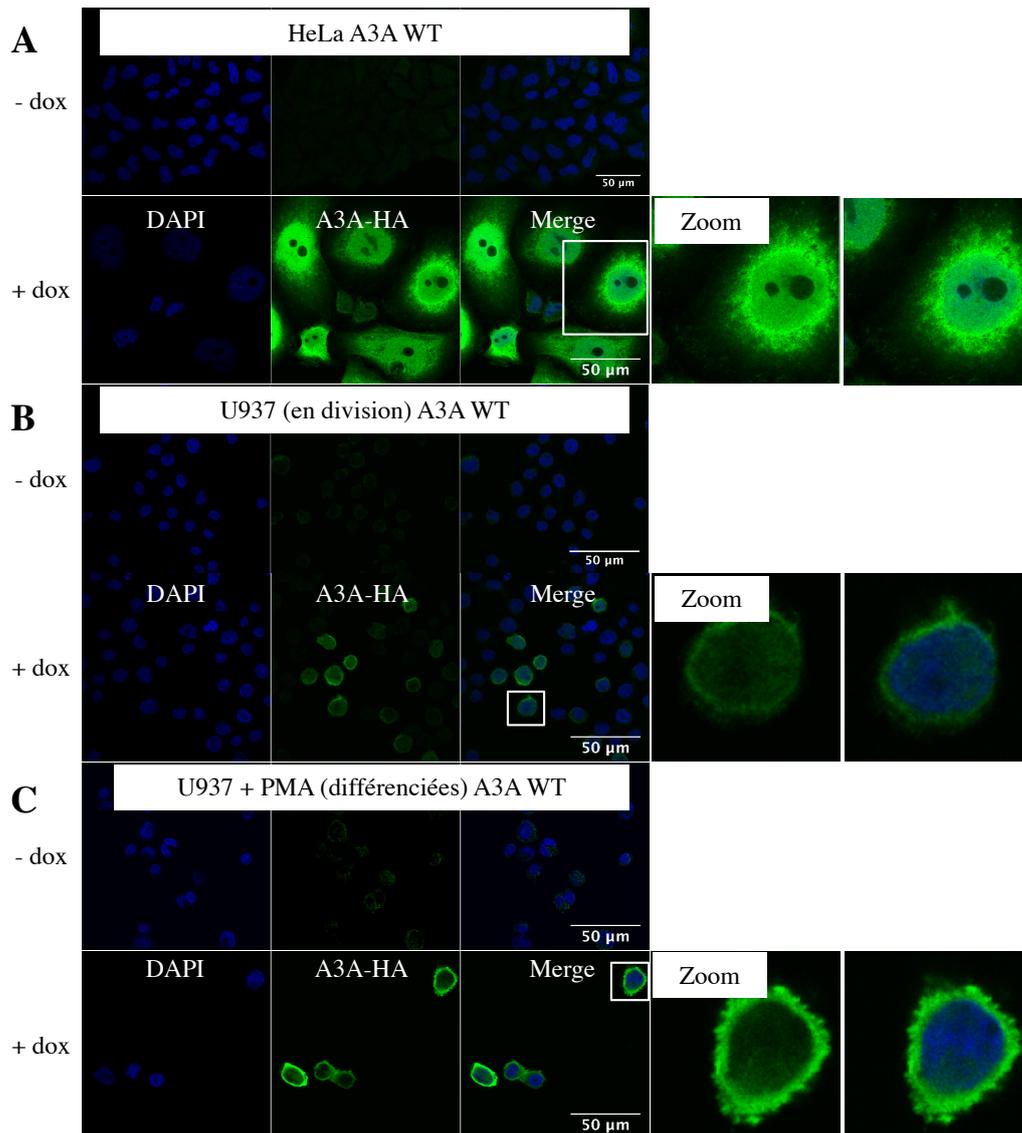


FIGURE 3.6 – A3A est présente dans le cytoplasme et le noyau des cellules en division (HeLa ou U937) et son expression nucléaire diminue après différenciation des cellules U937. Des cellules HeLa (A), U937 en division (B) et U937 différenciées (C) ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL). Après 48h d'induction, un marquage spécifique de l'étiquette HA d'A3A (Alexa Fluor488) et un marquage de l'ADN cellulaire (DAPI) ont été effectués avant analyse sur un microscope confocal.

des cellules en division est modifiée, mais pas celle des cellules différenciées, et cela est corrélé à la localisation d'A3A.

Une quantification de l'intensité moyenne de fluorescence dans le noyau (N) et le cytoplasme (C) des U937 \pm PMA a été effectuée. On présente ici les rapports $\frac{N}{N+C}$, $\frac{C}{N+C}$ et $\frac{N-C}{N+C}$ (cf figure 3.8). L'intensité moyenne de fluorescence dans le noyau est significativement abaissée ($p < 0.001$) dans les U937 différenciées par rapport aux U937 en division. De façon opposée, l'intensité moyenne de fluorescence dans le noyau est significativement plus élevée dans les cellules myéloïdes différenciées

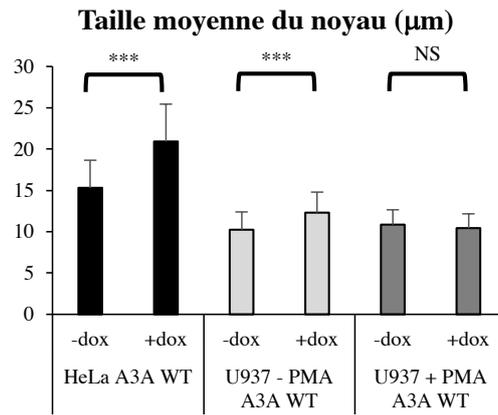


FIGURE 3.7 – L’induction d’A3A dans les cellules en division conduit à une augmentation significative de la taille du noyau. Des cellules HeLa et U937 ± PMA ont été induites à la doxycycline et la taille du noyau (diamètre) a été mesurée sur des images d’immunofluorescence 48h après induction. Les résultats présentés correspondent à 70 cellules sur 4 expériences indépendantes pour les HeLa et 110 cellules sur 6 expériences indépendantes pour les U937. La moyenne et l’écart-type sont représentées et les astérisques indiquent des différences significatives après un test de Student (NS = non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

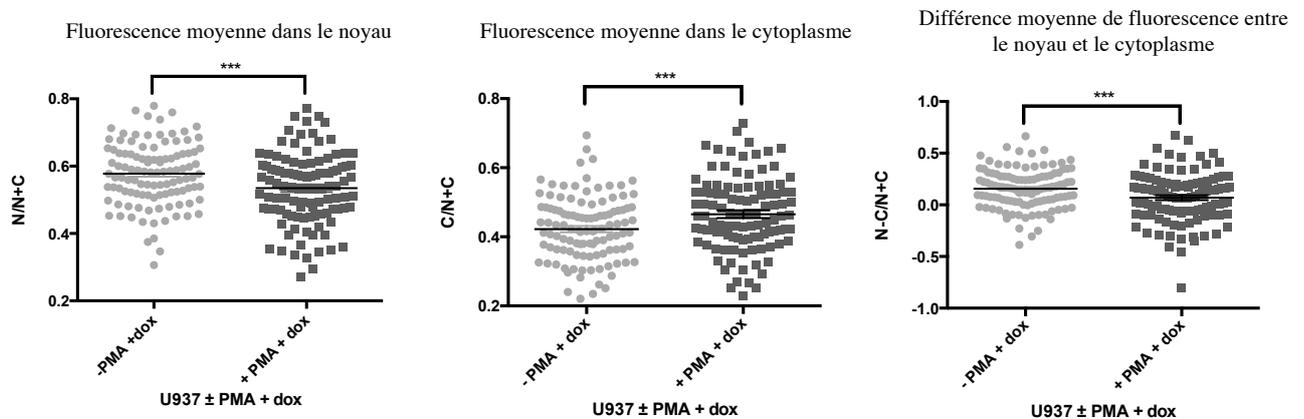


FIGURE 3.8 – A3A est présente dans le cytoplasme et le noyau des cellules en division (HeLa ou U937) et son expression nucléaire diminue après différenciation des cellules U937. Les grandeurs représentées sont $\frac{N}{N+C}$, $\frac{C}{N+C}$ et $\frac{N-C}{N+C}$. Pour chaque graphique, un point représente une cellule et la barre correspond à la moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les astérisques indiquent des différences significatives après une analyse de la variance (Anova) : *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

que dans les cellules myéloïdes en division ($p < 0,001$). Dans les cellules en division, la différence $\frac{N-C}{N+C}$ est plus élevée que dans les cellules différenciées, ce qui confirme que la localisation d’A3A est plus

nucléaire dans les cellules en division. Nos résultats montrent donc une modulation des quantités nucléaires et cytoplasmique d'A3A dans les cellules différenciées. On peut postuler qu'une relocalisation cytoplasmique d'A3A dans les cellules différenciées permettrait de protéger (au moins partiellement), l'ADN nucléaire de l'activité cytidine désaminase.

Afin de confirmer ou non l'importance de la localisation cellulaire d'A3A, nous avons ajouté une étiquette NLS (PAAKRVKLD) à son extrémité C-terminale qui permet de forcer une localisation nucléaire.

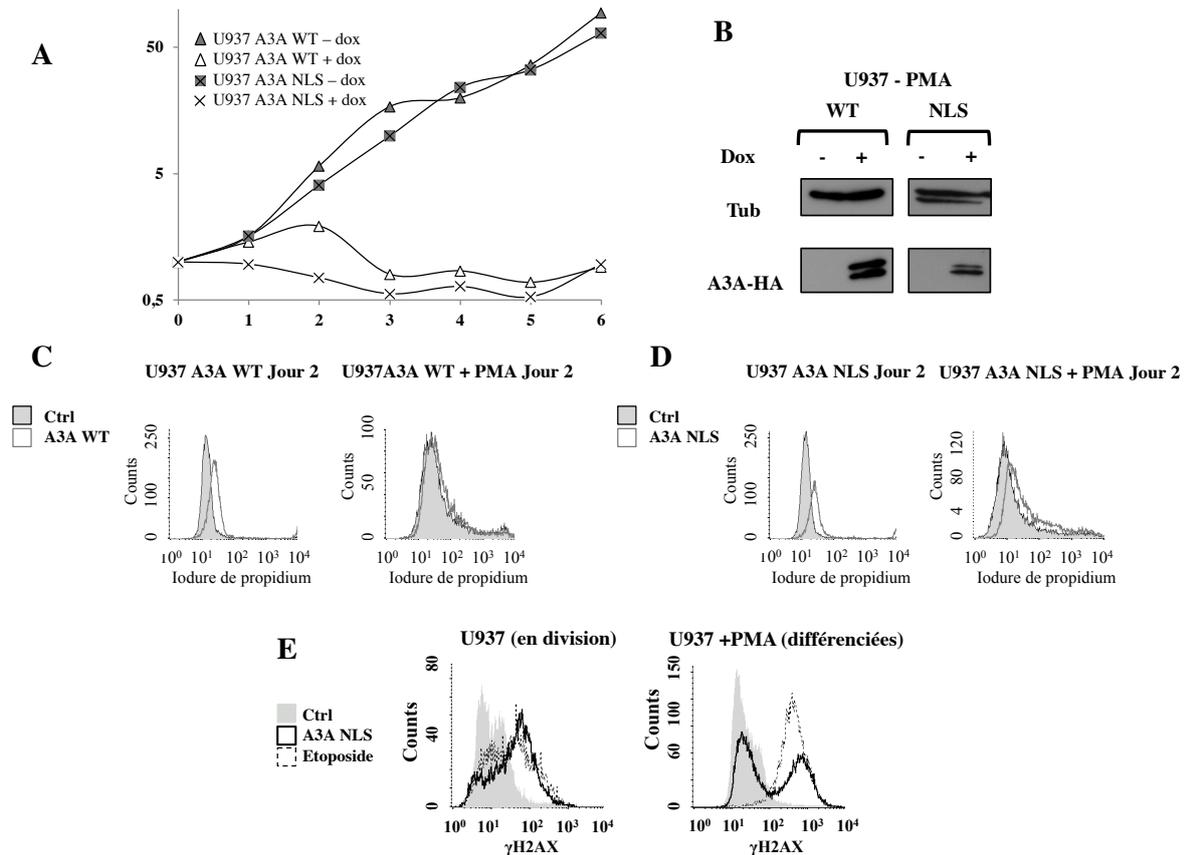


FIGURE 3.9 – Le mutant NLS d'A3A induit des cassures double brin dans l'ADN nucléaire des cellules différenciées. A. Des cellules U937 codant pour A3 WT ou le mutant NLS ont été induites à la doxycycline et leur prolifération suivie pendant 7 jours. B. Expression inductible d'A3A WT et NLS en U937 traitées à la doxycycline (0,5 mg/mL) pendant 48h. C et D. Un marquage à l'iodure de propidium des cellules différenciées ou non a permis de déterminer la proportion de cellules mortes après 48h d'induction, respectivement en présence d'A3A WT ou A3A NLS. E. Des cellules U937 en division ou différenciées à la PMA ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL). 48h après induction, un marquage des cassures double-brin est effectué et les cellules sont analysées par cytométrie en flux. L'étoposide (50 μ m) est utilisée comme contrôle positif.

Les cellules U937 inductibles codant pour la protéine A3A-NLS ont été stimulées à la doxycycline, puis leur prolifération a été suivie en comptant le nombre total de cellules pendant 7 jours. On retrouve le même phénotype d'arrêt de prolifération pour la protéine A3A-NLS qu'avec A3A WT (cf figure 3.9 A). Un marquage à l'iodure de propidium a été effectué dans les cellules exprimant A3A WT ou NLS afin de confirmer ou non la mort des cellules (cf figure 3.9 C et D). Conformément à notre hypothèse, la présence de l'étiquette NLS entraîne une mortalité dans les U937 traitées à la PMA, ce qui est cohérent avec notre hypothèse que la localisation d'A3A est importante pour sa toxicité. Il est très intéressant de noter que la protéine possédant l'étiquette NLS est capable d'induire une mortalité cellulaire accrue dans les cellules différenciées. De même, lorsqu'on regarde le marquage des cassures double-brin, on constate qu'A3A-NLS est capable d'induire des dommages à l'ADN aussi bien dans les U937 en division que dans les U937 différenciées à la PMA, alors que la protéine WT n'induisait pas de dommages dans les cellules différenciées (cf figure 3.9 E). Nous avons vérifié que la localisation de la protéine A3A portant l'étiquette NLS était différente de celle de la protéine sauvage. Pour cela, les cellules codant pour A3A-NLS ont été différenciées ou non à la PMA pendant 48 h puis induites à la doxycycline pendant 36h. Un marquage d'immunofluorescence d'A3A (vert) et du noyau (DAPI) a été réalisé. Sur les images, certaines cellules présentent le phénotype attendu (expression majoritairement nucléaire d'A3A-NLS) tandis que d'autres présentent un phénotype comparable à ce qui était observé pour A3A WT. La population semble hétérogène, ce qui est confirmé lorsqu'on regarde l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules différenciées, puisqu'on observe deux pics (cf figure 3.9 E).

Les cellules U937 A3A NLS ne sont donc pas une population homogène et il est probable que seule une partie des cellules ait été correctement transduite. Une analyse quantitative du rapport $\frac{N-C}{N+C}$ dans les cellules U937 A3A WT ou U937 A3A NLS a tout de même montré que la protéine A3A-NLS était significativement enrichie dans le noyau par rapport à la protéine WT, que ce soit dans les cellules en division ou dans les cellules différenciées (cf figure 3.10). Il existe donc une proportion significative de la population où le mutant présente bien une localisation nucléaire enrichie par rapport à la protéine sauvage. Les résultats obtenus permettent de voir un effet inédit d'induction de dommages à l'ADN dans le noyau de cellules différenciées.

Ces résultats suggèrent fortement que la localisation nucléaire d'A3A est un élément essentiel de l'édition de l'ADN nucléaire de l'hôte. La protéine A3A-NLS est présente dans le noyau des cellules U937 traitées à la PMA et génère des cassures double brin, alors qu'il n'y a pas de réplication de l'ADN dans ces cellules. Il semble donc que la réplication de l'ADN ne soit pas nécessaire pour qu'A3A ait accès à l'ADN cellulaire.

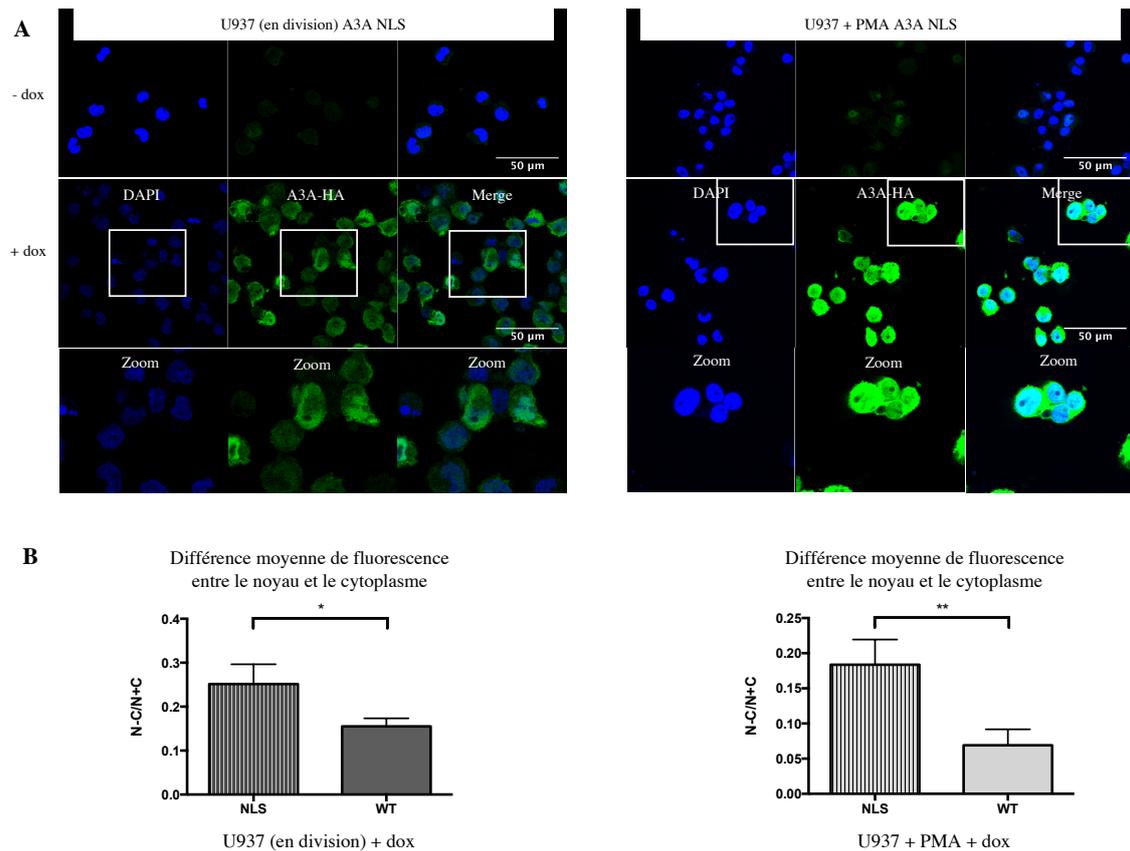


FIGURE 3.10 – **La protéine A3A-NLS est plus localisée dans le noyau que la protéine sauvage.** A. Des cellules U937 en division et U937 différenciées ont été induites à la doxycycline (0,5 mg/mL). Après 48h d'induction, un marquage spécifique de l'étiquette HA d'A3A (Alexa Fluor488) et un marquage de l'ADN cellulaire (DAPI) ont été effectués avant analyse sur un microscope confocal. B. La fluorescence moyenne dans le noyau et le cytoplasme ont été mesurées et on présente la grandeur $\frac{N-C}{N+C}$ dans pour les cellules exprimant la protéine sauvage ou le mutant NLS. B. Pour chaque graphique, la moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM) a été représentée. Les astérisques indiquent des différences significatives après un test de Student : *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

F. Les dommages à l'ADN générés par A3A conduisent à la production de ROS et à la mort de la cellule

Le mécanisme par lequel les dommages à l'ADN induits par A3A conduisent à la mort des cellules n'est pas caractérisé. Une étude réalisée en 2012 [Kang et al., 2012] a proposé que les dommages à l'ADN conduisent à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : O_2^- , H_2O_2 ou HO^\cdot), qui vont à leur tour conduire à l'apoptose des cellules. La voie de signalisation des dommages à l'ADN est capable de reconnaître l'histone γ H2AX. Elle conduit à l'activation de l'enzyme Nox1, qui appartient à la famille des Noxes (NAD(P)H oxydases) et les ROS produites vont entraîner la mort de la cellule par apoptose. On peut inhiber la formation de ROS avec le chlorure de diphényliodonium (DPI), un

inhibiteur à large spectre des enzymes contenant des flavines dont les Noxes font partie. On peut également protéger la cellule des oxydants grâce à l'antioxydant N-acétyl cystéine (NAC) qui va piéger les ROS formées (cf figure 3.11 A).

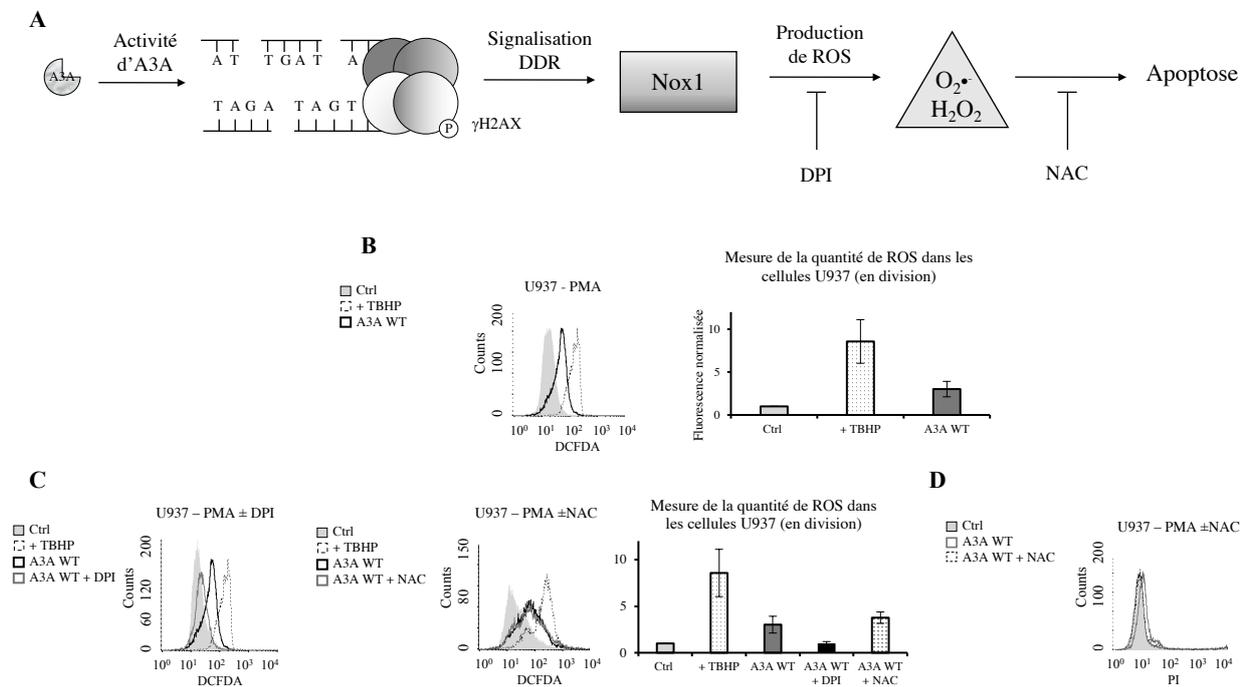


FIGURE 3.11 – La formation de ROS à partir des dommages à l'ADN générés par A3A est responsable de la mort de la cellule. A. Mécanisme proposé pour l'induction de la mort cellulaire par A3A. Le DPI est un inhibiteur de Nox1 et le NAC est un antioxydant capable de séquestrer les ROS. B. Mesure de la production de ROS par les cellules U937 en division. Le profil de fluorescence d'une expérience représentative correspond au panel de gauche. Les résultats présentés sur le panel de droite correspondent à l'intensité moyenne de fluorescence U937 normalisée par rapport au contrôle. La moyenne \pm erreur standard de la moyenne est représentée et correspond à 7 expériences indépendantes. C. La mesure de la production de ROS a été réalisée en présence de DPI ou de NAC. Les profils de fluorescence correspondent à une expérience représentative et le graphique présente l'intensité moyenne de fluorescence normalisée par rapport au contrôle. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne correspondant à 3 expériences indépendantes sont représentés. D. Marquage à l'iodure de propidium des cellules U937 \pm NAC.

Les cellules U937 représentant un modèle myéloïde plus physiologique, nous avons écarté les cellules HeLa de cette partie de l'étude. Des cellules U937 induites à la doxycycline pendant 48h (en présence ou non de DPI ou de NAC) ont été traitées au DFCDA, puis la formation de ROS a été mesurée par cytométrie en flux. Le TBHP (tert-butyl hydrogene peroxide) est un contrôle positif de l'induction de ROS. La présence d'A3A est associée à une production accrue de ROS dans les cellules (cf figure 3.11

B). En traitant les cellules au DPI, on constate que la quantité de ROS produites retombe au niveau de la quantité de ROS observée dans les cellules non induites (cf figure 3.11 C). L'induction de ROS à partir des cassures double brin liées à A3A passe donc bien par la voie des enzymes Nox.

Nous nous sommes également intéressés à la mortalité des cellules après l'induction de ROS. Comme on l'a déjà montré (cf figure 3.3), l'induction d'A3A induit une mortalité cellulaire qu'on peut détecter par un marquage positif à l'iodure de propidium. Lorsqu'on observe ce qui se passe dans le cas de cellules U937 traitées au N-acétyl cystéine, on constate qu'il n'y a plus de mortalité cellulaire, ce qui se traduit par un marquage négatif à l'iodure de propidium (cf figure 3.11 D).

Ces résultats proposent pour la première fois un mécanisme permettant de faire le lien entre activité éditrice d'A3A, dommages à l'ADN et mort de la cellule. La production d'espèces réactives de l'oxygène pourrait être le lien entre A3A et la mort des cellules.

G. Les isoformes courte et longue d'A3A semblent avoir le même comportement

L'ARNm d'APOBEC3A conduit à l'expression de deux protéines via un site interne d'entrée du ribosome : l'isoforme longue (199 acides aminés) et l'isoforme courte à laquelle il manque les 12 premiers acides aminés. Dans le but de savoir si les deux isoformes ont des propriétés différentes, nous avons étudié le comportement des mutants M13I (isoforme longue) Δ 13 (isoforme courte). Nous avons donc étudié la prolifération cellulaire des cellules exprimant ces différents mutants, ainsi que la capacité de ces protéines à induire des dommages à l'ADN.

Les mutants Δ 13 et M13I conduisent à une forte réduction de la prolifération cellulaire dans les cellules HeLa comme dans les cellules U937 (cf figure 3.12 B). Afin de déterminer s'ils étaient capables d'induire les mêmes dommages à l'ADN que la protéine sauvage, nous avons mesuré l'apparition d'histone γ H2AX dans des cellules HeLa induites à la doxycycline et codant pour A3A WT, A3A Δ 13 ou A3A M13I. On constate qu'A3A Δ 13 et A3A M13I sont également capables d'induire des dommages à l'ADN, à l'instar de ce qu'on avait observé pour le sauvage (cf figure 3.12 C). Il semble donc que les deux isoformes d'A3A induisent des cassures double brin et un arrêt de la prolifération et qu'elles jouent un rôle redondant.

Un mutant catalytiquement inactif d'A3A, le mutant E72Q a également été étudié en cellules HeLa. Les cellules exprimant A3A E72Q après induction prolifèrent de la même façon que les cellules contrôle (cf figure 3.12 B). De plus, le mutant E72Q n'induit pas de cassures double brin dans les cellules (cf figure 3.12 C), ce qui nous permet d'affirmer que c'est bien l'activité catalytique d'A3A qui est responsable de l'induction de dommages à l'ADN et donc de l'arrêt de prolifération.

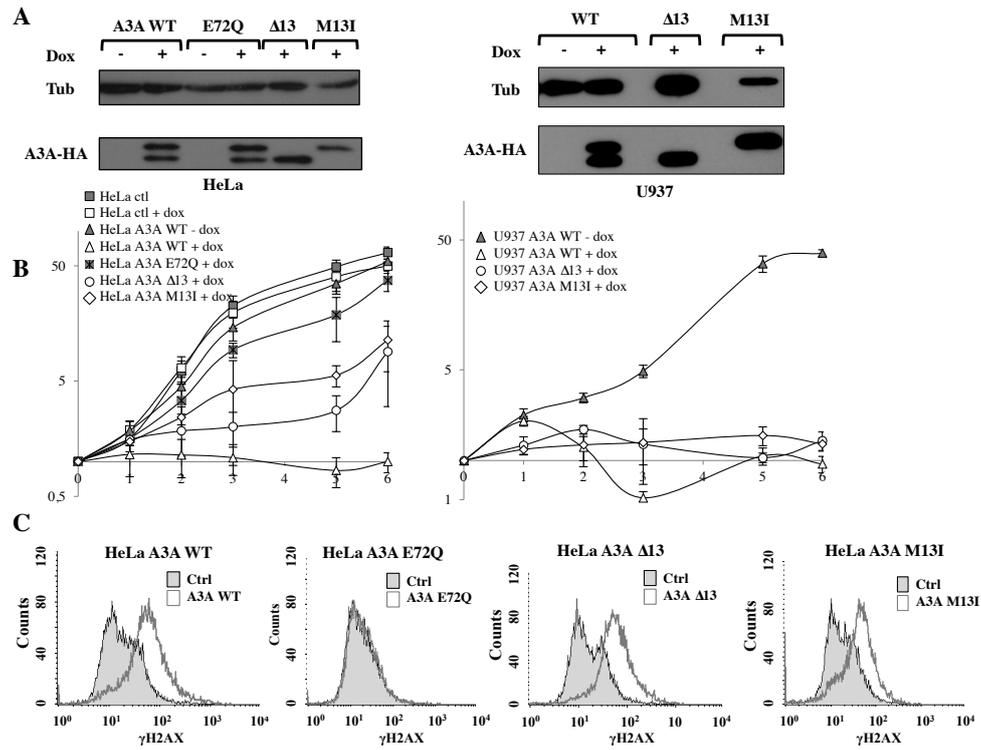


FIGURE 3.12 – Les deux isoformes d'A3A ont le même comportement : elles sont capables d'induire des cassures double brin dans le noyau des cellules en division et de conduire à un arrêt du cycle cellulaire.

Chapitre 4

Discussion

Régulation de l'activité d'A3A

A3A, comme les deux autres A3 à simple domaine catalytique (A3C et A3H), est capable d'entrer dans le noyau des cellules où elle est exprimée, grâce à sa petite taille (23 kDa). Une étude par l'équipe du professeur Harris [Land et al., 2013] indique qu'A3A est cytoplasmique de façon prédominante dans les monocytes primaires et la lignée monocyttaire THP-1 différenciée à la PMA. Nos travaux ont montré qu'A3A est majoritairement cytoplasmique dans les cellules U937 différenciées à la PMA. Ces résultats montrent donc qu'A3A est plutôt cytoplasmique dans les cellules myéloïdes différenciées. Cependant, l'effet que nous observons est une modulation fine, tandis que l'étude d'Harris proposait une exclusion totale du noyau dans les cellule myéloïdes primaires. Une autre étude publiée en 2016 a proposé qu'A3A conserve sa capacité à entrer dans le noyau des cellules HePaRG arrêtées en G1 et que l'absence de génotoxicité soit liée à l'absence de réplication [Green et al., 2016].

L'anticorps anti-A3A utilisé dans l'étude de l'équipe d'Harris reconnaît l'extrémité C-terminale d'A3A, qui est totalement identique à celle d'A3B et dont seulement 3 acides aminés sont différents de celle d'A3G. Il est donc probable que le signal cytoplasmique détecté dans ce cas ne soit pas uniquement lié à A3A. On peut également remarquer un signal nucléaire faible mais non nul dans les THP-1 et dans les monocytes primaires. On peut proposer l'hypothèse qu'une faible quantité d'A3A est présente dans le noyau, et que le fort signal cytoplasmique lié à A3A et A3G donne l'impression qu'A3A est exclue du noyau. De plus, A3A, au contraire d'A3G, ne possède pas de séquence d'export nucléaire caractérisée. Il est donc peu probable qu'A3A soit totalement exclue du noyau, surtout que sa petite taille lui permet de traverser les pores nucléaires par diffusion passive.

Il paraît raisonnable de proposer qu'A3A est capable d'aller dans le noyau et qu'un mécanisme encore non défini l'empêche d'agir sur l'ADN nucléaire des cellules différenciées. Il peut s'agir d'une inactivation fonctionnelle de la protéine qui inhiberait son activité nucléaire ou d'une dégradation dans

le noyau. Cela passerait par des modifications post-traductionnelles ou par une interaction avec un cofacteur capable de l'inhiber.

Un rôle de TRB3 a été proposé dans la régulation d'A3A, et bien qu'il soit sujet à controverse, il ouvre la possibilité d'une régulation d'A3A par dégradation nucléaire [Aynaud et al., 2012], [Land et al., 2013]. Puisque la localisation cytoplasmique majoritaire d'A3A n'a été observée que dans les cellules myéloïdes, il est possible qu'une protéine exprimée uniquement dans ces cellules soit capable d'induire la dégradation d'A3A située dans le noyau. Dans cette situation, même si l'expression d'A3A était induite fortement par l'IFN, la quantité dans le noyau serait maintenue à des niveaux faibles et un faible niveau d'expression d'A3A a été associé à une survie de la cellule. La quantité de sites édités serait suffisamment faible pour permettre à la machinerie de réparation de l'ADN de tous les éliminer, sans pour autant générer les cassures double brin létales pour la cellule.

À ce jour, aucune protéine capable de modifier la localisation cellulaire d'A3A n'a été décrite. Par contre, un autre membre de la famille des cytidine désaminases, AID, voit son activité modifiée par l'interaction avec la protéine nucléaire CTNNB1 [Conticello et al., 2008]. La capacité d'AID à induire une diversification des anticorps est directement liée à son interaction avec CTNNB1. Il a été proposé que CTNNB1 adresse AID au locus des immunoglobulines et permet une édition localisée. De façon analogue, on peut imaginer une protéine qui séquestrerait A3A hors des sites de transcription afin d'éviter une édition de l'ADN nucléaire.

La dimérisation d'A3A a été observée en solution et dans une structure cristallographique et a permis de proposer un autre modèle de régulation de son activité [Bohn et al., 2015]. Lorsqu'A3A est présente à de faibles concentrations, l'enzyme s'associe sous forme de monomère à son substrat ADN simple brin, avec une affinité moyenne. Lorsque la concentration d'A3A augmente, la protéine se dimérise et devient plus affine pour son substrat. Ainsi, l'activité enzymatique serait directement corrélée à la quantité de protéine présente dans le compartiment cellulaire considéré.

Le polymorphisme qui induit la délétion du gène d'A3B dans le génome humain conduit à l'expression d'un ARNm mixte A3A-3' UTR d'A3B. La protéine en résultant est 15 fois plus exprimée qu'A3A avec son propre 3'UTR [Caval et al., 2014a]. L'hypothèse qu'un miARN s'associe au 3'UTR natif d'A3A a été formulée. On peut proposer que les cellules myéloïdes soient spécifiquement capables d'exprimer un miRNA spécifique d'A3A qui leur permettrait de réguler son expression. Cependant, cette régulation se ferait à l'échelle de la cellule entière et n'aurait pas d'influence sur la localisation différenciée de la protéine.

Une dernière hypothèse repose sur les modifications post-traductionnelles. AID et A3G, deux autres membres de la famille des cytidines désaminases peuvent être régulées par phosphorylation par l'enzyme PKA [Demorest et al., 2011]. Ainsi, la thréonine 27 et la thréonine 218 d'AID et A3G respectivement peuvent être phosphorylées, ce qui contribue à diminuer l'activité de ces protéines. Grâce à la nouvelle

méthode de purification d'A3A que nous avons développée, il serait intéressant de voir si A3A possède également un site phosphorylé (qui serait phosphorylé dans les cellules différenciées et pas dans les cellules en division).

Intérêt d'encoder deux isoformes d'A3A distinctes

Une étude du laboratoire du professeur Lingappa réalisée *in vitro* sur des protéines purifiées avait suggéré que la forme longue avait une activité catalytique plus faible. Nos travaux et ceux d'autres laboratoires n'ont pas noté de différence de comportement entre les deux isoformes en cellules HeLa [Mussil et al., 2013]. La forme courte comme la forme longue possèdent la capacité d'induire des cassures double brin dans l'ADN nucléaire des cellules en division. On peut alors se demander quel est l'intérêt pour la cellule de conserver deux formes distinctes.

Lorsqu'on s'intéresse à la cinétique d'expression d'A3A en cellules dendritiques primaires stimulées à l'IFN- α (données non présentées), on constate que la forme longue est exprimée en premier et qu'elle persiste plus longtemps dans la cellule.

Lors de l'infection d'une cellule dendritique par un virus, la cinétique des phases précoces est ralentie et cela permet à la cellule d'organiser sa défense. La possibilité de synthétiser deux protéines antivirales (les deux isoformes d'A3A) à partir d'un seul ARN messenger pourrait constituer un avantage cinétique pour la cellule dans sa lutte contre le virus et expliquerait que les deux isoformes aient été conservées.

Cependant, bien que les deux isoformes soient capables d'induire des cassures double brin dans le génome de cellules HeLa, l'efficacité de leur action antivirale n'est pas connue. De même, il n'existe pas de données claires sur la localisation des deux isoformes, et il serait intéressant de savoir si les deux isoformes sont présentes à la fois dans le noyau et le cytoplasme, ou si l'une d'entre elles possède une localisation préférentielle.

Le rôle ambivalent des ROS

Comme nous l'avons montré, les cassures double brin induites suite à l'édition de l'ADN nucléaire par A3A sont responsables de la production de ROS dans les cellules en division. Les ROS sont de forts oxydants et sont capables d'oxyder la plupart des molécules du vivant (ADN, protéines, lipides et carbohydrates). En particulier, les ROS endogènes sont capables de générer 5000 lésions simple brin sur l'ADN par cycle de réplication. Il s'agit de cassures simple brin, de sites apuriques/apyrimidiques, de produits d'oxydation (8-oxo-guanine et thymine glycol) et de produits d'alkylation [Barzilai and Yamamoto, 2004]. Environ 1 % de ces lésions simple brin sont converties en cassures double-brin, le plus

souvent lors de la réplication de l'ADN, le reste des lésions étant réparé par les mécanismes cellulaires. Ces cassures double brin vont conduire à la production d'histone γ H2AX [Tanaka et al., 2006].

Il est donc très probable que les dommages à l'ADN induits par A3A soient amplifiés par la production de ROS, qui vont à leur tour induire des dommages supplémentaires dans l'ADN nucléaire. Il serait très intéressant de réaliser une étude cinétique afin de caractériser l'apparition de cassures double brin et de ROS dans les cellules exprimant A3A. Des données préliminaires indiquent qu'A3A est exprimée rapidement après induction (dès 8h dans les cellules dendritiques stimulées à l'IFN- α et dès 4h dans notre lignée inductible U937). Cette expression s'accompagne immédiatement de dommages à l'ADN dans les cellules en division.

Le traitement de cellules avec des agents chimiques capables d'induire des dommages à l'ADN entraîne une production de ROS encore plus rapide (elle a lieu dans l'heure qui suit l'apparition de dommages à l'ADN) [Kang et al., 2012]. Ainsi, il est possible que dès qu'un niveau suffisant de cassures double brin est atteint dans la cellule, la production de ROS et l'amplification des cassures conduisent irrémédiablement à la mort des cellules.

Le stress oxydatif chronique a été associé à une diminution de la quantité de l'histone H2AX dans le cas de chimiothérapies pour traiter le cancer du sein [Gruosso et al., 2016]. Dans ces circonstances, la présence élevée de ROS serait associée à un faible signalement des cassures double-brin. Ainsi, la cellule accumulerait de plus en plus de cassures double brin, sans pouvoir les signaler efficacement à la machinerie de réparation de l'ADN et donc sans pouvoir les réparer. Cette amplification des dommages à l'ADN conduirait rapidement à la mort des cellules. Ce phénomène permettrait donc une élimination efficace des cellules cancéreuses en présence de quantités importantes de ROS.

On peut se demander si la réponse cellulaire serait la même dans des cellules différenciées. En effet, on a longtemps pensé que la formation de ROS était une conséquence néfaste du métabolisme aérobie de la cellule. La mise en évidence des enzymes Nox (NADPH oxydases) et DUOX (dual oxydase), dont la fonction est la production de ROS a remis en cause cette idée. Les ROS sont associés à l'explosion respiratoire qui a lieu dans les cellules phagocytaires après exposition à un micro-organisme ou à un médiateur inflammatoire. La destruction du micro-organisme contenu dans le phagosome serait alors due soit à l'action directe des ROS, soit à la libération de protéases capables de digérer l'intrus [Lambeth, 2004].

Les ROS sont capables de déclencher les récepteurs de l'apoptose comme TNF ou le récepteur Fas [Simon et al., 2000]. Le rôle de la mitochondrie est double : elle est capable de produire des ROS comme sous-produits du métabolisme, mais elle serait également la cible de ROS dans certaines cellules. Dans les granulocytes par exemple, l'activation des récepteurs de l'apoptose ne suffit pas à activer totalement la cascade des caspases et un rôle de la mitochondrie a été suggéré. L'oxydation des pores de la mitochondrie augmenterait la libération des ROS produits par cet organite, permettant

ainsi l'amplification de la cascade.

Cependant, comme on l'a vu précédemment, tout est une question d'équilibre. Plusieurs antioxydants sont impliqués dans la protection des cellules contre les ROS : le glutathion, la N-acétyl-cystéine et il existe également des enzymes comme la catalase ou la superoxyde dismutase (SOD) qui ont pour rôle de détruire les ROS dans l'organisme. Ainsi, comme ce qui a été observé pour les cassures double brin, il y a certainement établissement d'un équilibre entre production de ROS et neutralisation par la cellule, qui dans certains cas aboutit à la stimulation des voies de l'apoptose (ou de la nécrose) et dans d'autres cas permet la survie de la cellule.

Plus surprenant par rapport à ce que nous avons observé, des études ont corrélé les ROS produits par Nox1 (et en particulier H_2O_2) à la croissance cellulaire et à un phénotype tumorigénique [Suh et al., 1999], [Arnold et al., 2001]. Dans des cellules tumorales du côlon qui expriment Nox1, les niveaux de ROS sont plus élevés dans les cellules sous-confluentes que dans les cellules confluentes en arrêt de croissance [Perner et al., 2003]. Une surexpression de Nox1 et une génération de ROS sont également retrouvées dans des variants de kératinocytes humains [Chamulitrat et al., 2003]. A3A étant exprimée dans les kératinocytes, cette production accrue de ROS pourrait être en partie due à l'activité d'A3A.

On peut ici faire le lien avec le rôle antiviral d'A3A. En effet, un rôle anti-VIH a été décrit pour A3A seulement dans les cellules myéloïdes, tandis que son expression artificielle dans des cellules HeLa ou HEK 293T ne conduit pas à une restriction du virus et provoque même la mort des cellules. Dans les cellules myéloïdes et plus particulièrement dans les cellules phagocytaires, A3A pourrait être exprimée à des niveaux élevés sans risque de toxicité pour la cellule, grâce à la présence d'enzymes et de molécules antioxydantes. L'action d'A3A, conduirait alors à l'édition de l'ADN du pathogène entrant et à sa neutralisation par la cellule, tandis que les éventuels ROS issus d'une action d'A3A sur l'ADN nucléaire seraient neutralisés. Au contraire, dans les cellules non-myéloïdes, aucun mécanisme de protection n'étant présent, l'expression d'A3A conduirait à la mort des cellules sans effet antiviral. Il serait intéressant de regarder le niveau d'édition de pathogènes se répliquant dans le cytoplasme des cellules myéloïdes (*Leishmania* dans les macrophages par exemple).

Induction de ROS et signalisation

La mort cellulaire a lieu principalement soit par apoptose (non-inflammatoire) soit par nécrose (inflammatoire). Le facteur de nécrose tumorale (TNF) joue un rôle central dans la survie des cellules, l'apoptose et la nécrose, ainsi que dans la communication intercellulaire. La dérégulation de ces processus est une marque souvent retrouvée dans les maladies inflammatoires et les cancers. Dans ces contextes, TNF régule un réseau de signalisation complexe qui peut déclencher la mort des cellules ou participer à leur survie [Brenner et al., 2015].

La forme soluble de TNF (sNTF) s'associe au récepteur TNFR1 qui est exprimé de façon ubiquitaire à la surface de tous les types cellulaires. La transduction du signal passe par l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Un deuxième récepteur de TNF, TNFR2 est présent seulement dans la membrane des cellules immunes et endothéliales et sa stimulation permet de moduler la régénération tissulaire et la réponse immunitaire.

Les ROS sont impliqués dans la régulation de la voie de signalisation TNF-TNFR, impliquée dans la survie ou la mort des cellules. Leur synthèse est accrue dans les cellules après liaison de TNF à son récepteur et ils sont capables de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires en activant NF- κ B [Morgan and Liu, 2011]. Une étude réalisée en macrophages murins a mis en évidence le fait qu' H_2O_2 active l'expression de TNF via les voies p38 et JNK. Ainsi, on a une boucle de régulation positive dans laquelle les ROS induits par TNF conduisent à une production de ROS.

Les ROS peuvent déclencher la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose selon la sévérité du stress oxydatif [Teramoto et al., 1999]. Suite à une stimulation par les ROS, NF- κ B peut contribuer à la mort de la cellule en interagissant avec la voie JNK ou en induisant l'expression de protéines productrices de ROS. Il peut également contribuer à la survie de la cellule en induisant l'expression de protéines antioxydantes (l'enzyme superoxyde dismutase au manganèse, SOD2 en est l'exemple le plus courant). Le rôle de NF- κ B dans l'activation ou la neutralisation des ROS dépend du type cellulaire : en particulier, les cellules immunitaires sont plutôt caractérisées par une forte production de ROS [Anrather et al., 2006].

Les ROS dérivés des mitochondries contribuent à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) dans des monocytes traités au LPS [Bulua et al., 2011]. On peut se demander si les ROS induits par l'action d'A3A sont également capables de conduire à la sécrétion de TNF ou d'IL-6 dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène permettrait de transmettre le signal d'inflammation aux cellules environnantes et ainsi de mettre l'organisme entier en alerte dans le cas d'un pathogène. Quelles que soient les modalités d'action, il est important que la réponse cellulaire aux ROS soit finement régulée. Ainsi, quand trop de dommages sont apparus dans une cellule, il est plus avantageux pour l'organisme de la supprimer, au bénéfice des cellules environnantes.

A3A, inflammation et cancer

L'ADN se trouvant dans le cytoplasme, qu'il soit d'origine endogène (mitochondrie) ou pathogène (virus) est une source de stress pour la cellule. A3A est capable de désaminer l'ADN cytoplasmique et il a été proposé par l'équipe du professeur Wain-Hobson que ce mécanisme participe au catabolisme de l'ADN [Suspène et al., 2011a]. En participant à la dégradation de l'ADN cytoplasmique, A3A aurait pour effet de diminuer le signal de danger dans la cellule et d'empêcher que le signal inflammatoire ne

se propage de façon trop importante [Suspène et al., 2017]. Ces observations sont en contradiction avec le rôle antiviral d'A3A en cellules myéloïdes. En effet, selon ce modèle, A3A serait un régulateur négatif de la réponse interféron, et inhiberait ainsi l'expression des protéines codées par les ISG. Pourtant, des études menées au laboratoire ont montré que l'expression d'A3A et de nombreux ISG étaient fortement stimulée après infection de cellules myéloïdes par le VIH-1. Il serait donc intéressant de voir si l'implication d'A3A dans le catabolisme de l'ADN est modulée en présence d'un pathogène, ce qui permettrait à la cellule de signaler efficacement l'infection.

Nos travaux ont mis en évidence le fait que l'activité éditrice d'A3A conduit à la production de ROS dans les cellules en division. Il a été montré que la présence de ROS peut conduire à l'activation de la réponse inflammatoire via les protéines MAP kinases et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [Mittal et al., 2014].

En 1863, Rudolf Virchow repère la présence de leucocytes associés à des tumeurs et fait une connexion entre inflammation et cancer. Il émet l'hypothèse que les origines du cancer se situent à des sites d'infection chronique. Des études récentes ont confirmé cette hypothèse et un grand nombre de cancers se développent au niveau de sites d'infection, d'irritation chronique ou d'inflammation. Le microenvironnement tumoral, au sein duquel les cellules inflammatoires jouent un rôle important, est un participant essentiel impliqué dans le processus tumorigénique, la prolifération cellulaire, la survie de la tumeur et sa migration [Balkwill and Mantovani, 2001].

Un certain nombre de cancers sont associés à une infection virale ou à une inflammation persistente (cancer de la vessie, carcinome oesophagien, cancer du col de l'utérus, sarcome de Kaposi, carcinome pulmonaire ...). De plus, la prise de médicaments anti-inflammatoires pendant de longues durées est associée à un risque plus faible de développer un cancer du colon, des poumons, de l'estomac, de l'oesophage ou du sein. Un état d'inflammation persistant est donc néfaste à l'organisme, puisqu'il favorise l'apparition de divers cancers [Coussens and Werb, 2002], [Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009].

On peut se demander quel rôle joue A3A dans ces processus tumorigéniques et inflammatoires. L'expression de cette protéine est fortement augmentée en cellules myéloïdes après stimulation à l'IFN- α , et elle pourrait participer à l'activation des processus inflammatoires en plus de son rôle de facteur de restriction. La conséquence potentielle serait une toxicité pour la cellule, qui serait alors "sacrifiée" après avoir transmis le signal d'inflammation à l'organisme. Le fait que son expression soit quasi-indétectable en l'absence de stimulation IFN permet de proposer un autre mécanisme. L'expression basale d'A3A à bas bruit servirait cette fois-ci à limiter l'inflammation, en éliminant les ADN cytoplasmiques et sans présenter de danger pour la cellule.

En plus des cellules myéloïdes, A3A est exprimée dans plusieurs types de cellules épithéliales : les kératinocytes, les cellules des trompes de fallopes et les cellules du col de l'utérus. Plusieurs études ont

rapporté l'expression d'A3A dans ces cellules épithéliales soit dans un contexte inflammatoire, sans dans un contexte cancéreux. Ainsi, A3A est surexprimée dans les kératinocytes de patients atteints de psoriasis, une maladie inflammatoire chronique [Madsen et al., 1999]. Une étude très récente a montré l'expression d'A3A dans les cellules épithéliales des trompes de Fallope après exposition au fluide folliculaire [Brachova et al., 2017]. Ce fluide, libéré dans les trompes de Fallope lors de l'ovulation possède des propriétés inflammatoires, et contribue à la prolifération cellulaire. Il est également riche en ROS, et capable d'induire des ROS et des cassures double brin intracellulaires [Huang et al., 2015]. On peut penser à un modèle analogue à celui que nous avons observé dans la lignée myéloïde U937. Le fluide folliculaire induirait une expression d'A3A dans des cellules dont il active en même temps la prolifération. A3A éditerait le génome cellulaire, la prolifération rapide empêcherait une réparation efficace de l'ADN et contribuerait à amplifier le signal inflammatoire du fluide folliculaire. Dans ce contexte, les cellules épithéliales des trompes de Fallope pourraient acquérir un phénotype cancéreux et être à l'origine de carcinomes. L'observation de substitutions C vers T caractéristiques d'une activité cytidine désaminase dans les carcinomes ovariens séreux de haut grade (HGSC) appuie l'hypothèse qu'A3A joue un rôle dans l'apparition de cancers [Leonard et al., 2013].

Au contraire, A3A est un facteur de restriction de plusieurs papillomavirus humains (VPH16, VPH18). Il a été proposé que l'expression d'A3A influence le développement de tumeurs liées à HPV en éditant le génome cellulaire [Vartanian et al., 2008]. Une étude de 2015 a proposé qu'A3A ait plutôt un rôle anticancéreux dans le cas de lignées cellulaires dérivées de cancers du col de l'utérus. Les auteurs proposent que l'expression d'A3A inhibe le développement du cancer en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses et en atténuant leur migration [Chen et al., 2015].

Il semble donc que l'expression d'A3A nécessite une fine régulation de la part de l'organisme pour éviter l'apparition de cancers : son activité d'édition serait bénéfique pour l'organisme lorsqu'elle inhibe des virus oncogènes ou lorsqu'elle induit l'apoptose de cellules hypermutées, mais sa présence serait délétère lorsqu'elle entraîne l'accumulation de mutations dans le génome cellulaire.

Chapitre 5

Conclusion et perspectives

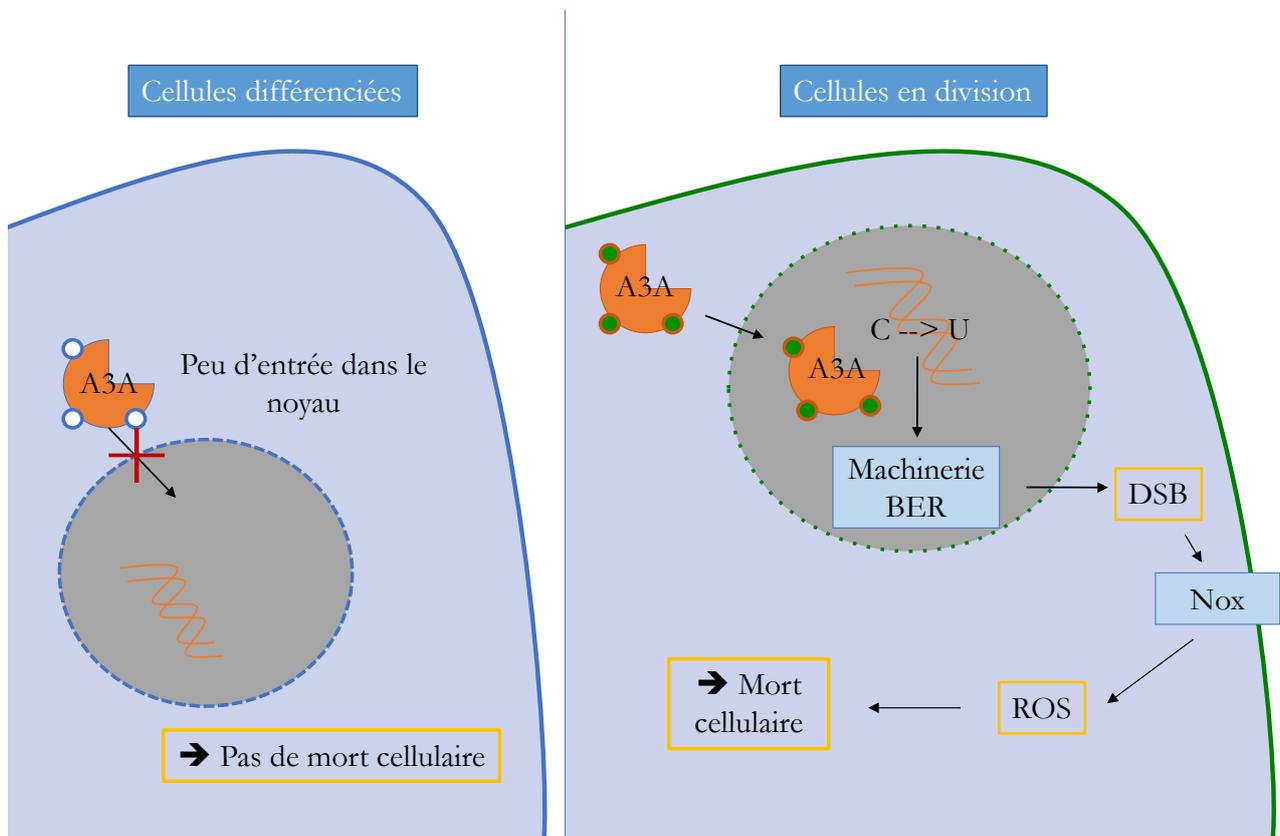


FIGURE 5.1 – **Caractérisation du comportement cellulaire d’A3A dans des cellules différenciées ou en division.** Dans les cellules myéloïdes différenciées, A3A est majoritairement cytoplasmique et n’induit pas de cassures double brin dans le génome. Au contraire, dans les cellules en division, A3A entre dans le noyau, est capable d’y désaminer l’ADN nucléaire, ce qui conduit à l’apparition de cassures double brin après action de la machinerie de réparation de l’ADN. Ces cassures double brin vont induire la production de ROS via les enzymes Nox et la mort des cellules.

En conclusion, nous avons caractérisé la différence de comportement d'A3A selon la lignée cellulaire étudiée (HeLa ou U937). Nous avons montré que le comportement génotoxique d'A3A n'était pas lié au type cellulaire dans lequel la protéine est exprimée, mais au fait que la cellule se divise ou soit différenciée. Les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) dans lesquelles A3A est exprimée naturellement sont donc probablement protégées par leur statut différencié.

Dans les cellules en division, A3A entre dans le noyau et édite les cytidines de l'ADN nucléaire. La machinerie de réparation de l'ADN va alors cliver les uraciles, ce qui conduit à des cassures d'ADN double brin lorsque de nombreux sites d'éditations sont proches. Ces cassures sont détectées par les acteurs de la réponse aux dommages à l'ADN et entraînent la phosphorylation de l'histone H2AX. L'activation des enzymes Nox conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la mort de la cellule par stress oxydatif.

Au contraire, dans les lignées myéloïdes qui ne se divisent pas, A3A est majoritairement située dans le cytoplasme, ce qui l'empêche d'avoir accès à l'ADN nucléaire. Ainsi, lorsque les cellules se différencient, A3A est exclue du noyau par un mécanisme encore inconnu. La demi-vie d'A3A étant d'environ 4h, les protéines contenues dans le noyau avant différenciation seront rapidement éliminées [Berger et al., 2011b]. L'expression d'A3A n'est alors associée à aucun signal de cassure double brin. La présence d'histone γ H2AX n'est pas détectée non plus dans les cellules myéloïdes primaires traitées à l'IFN- α .

Malgré l'absence de cassures double brin dans les cellules U937 différenciées à la PMA ou dans les cellules myéloïdes primaires, il serait intéressant de savoir si ces cellules produisent un niveau basal de ROS après expression d'A3A. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire suggèrent un faible niveau de ROS dans ces cellules différenciées. Cela pourrait être du à un niveau indétectable de cassures double brin dont le signal serait amplifié et conduirait à une production détectable de ROS. Une étude plus poussée est en cours afin de confirmer ces résultats.

On peut également se demander quel est l'effet de ces ROS dans la cellule et sur le milieu extracellulaire. La production importante de ROS dans la cellule pourrait libérer des cytokines pro-inflammatoires dans le milieu cellulaire qui agiraient sur les cellules voisines. Une analyse du surnageant des cellules exprimant A3A est en cours au laboratoire afin de déterminer s'il y a effectivement propagation d'un message pro-inflammatoire dans le milieu. La présence d'une grande quantité de ROS dans la cellule pourrait également avoir des conséquences néfastes sur la cellule, par exemple en aggravant les dommages à l'ADN. Dans un contexte plus global, on pourrait s'intéresser à l'effet de cette production accrue de ROS sur l'organisme et le développement de cancers *in vivo*. Pour cela, un modèle de souris humanisées exprimant les APOBEC3 humaines serait un outil à exploiter.

Une autre question soulevée est le rôle des deux isoformes d'A3A. Alors qu'en HeLa, le phénotype associé à chacune des isoformes semble similaire à celui en présence d'A3A WT, quelques points restent

à explorer. La localisation des deux isoformes reste à déterminer en cellules HeLa. L'induction de cassures double brin par les deux isoformes en cellules U937 différenciées ou non à la PMA n'a pas encore été déterminée et permettrait de confirmer les résultats obtenus en cellules HeLa.

Parmi les questions qui restent en suspens, le mécanisme par lequel la cellule régule l'activité d'A3A est toujours inconnu. Il serait intéressant de continuer la recherche de modifications post-traductionnelles ou de potentiels partenaires cellulaires impliqués dans cette régulation. On pourrait alors envisager de moduler l'expression de ces partenaires (par invalidation génétique) et voir quel effet cela aurait sur l'activité d'A3A.

Les résultats de cette thèse permettent de faire pour la première fois le lien entre dommages à l'ADN induits par A3A et production de ROS. Les ROS ont un rôle ambivalent dans les cellules, des dommages oxydatifs aux effets immunitaires. On peut se demander dans quelle mesure la présence d'A3A et les ROS qu'elle induit sont bénéfiques pour la cellule dans un rôle immunitaire et dans quelle mesure ces effets sont néfastes pour l'organisme car impliqués dans la carcinogénèse.

Il serait intéressant d'établir un lien entre les phénotypes décrits et le rôle antiviral d'A3A en cellules myéloïdes. Les deux isoformes semblent avoir un rôle redondant dans la cellule et on peut se demander si elles sont toutes les deux capables de restreindre le VIH-1 avec la même efficacité. L'induction d'A3A suite à l'infection par le VIH-1 pourrait également déclencher une réponse immunitaire dans les cellules voisines, afin de leur conférer un avantage cinétique sur le virus. L'exploration du lien entre A3A, VIH-1 et signalisation immunitaire permettrait de mieux comprendre la réponse immunitaire innée et ses conséquences pour l'organisme.

Chapitre 6

Annexe

Programme utilisé pour l'analyse des images d'immunofluorescence

Ces programmes ont été créés par Mathilde Dumond (Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes, ENS de Lyon).

Programme d'analyse (Script.py)

```
#!/usr/bin/python
# coding: utf8

from functions import *

#path = '/Users/mdumond/Desktop/Mathilde/Data'
path = '../Data'
pathOut = path+'/Out'
checkExists(pathOut)

fileOut = pathOut+'/summary.csv'
writer = initialize(fileOut)

# liste les fichiers à lire
listFiles = listAllFiles(path)

# pour chaque fichier
for f in listFiles:
    print(f)
    # lit et parse le fichier
```

```

data = readFile(f)
cond = extractInfo(f)
# une liste qui contient : la date, le type cellulaire, proteine, PMA, dox
# pour chaque cellule
print(cond)
k=1
for c in data:
    print(k)
    k+=1
    # fait les calculs
    lim = limits(c)
    # trouve les limites du cytoplasme et du noyau,
    #respectivement [lc1, ln1, ln2, lc2]
    #print('#### LIMITS ####')
    #print(lim)
    l = lengthNucl(c, lim)
    mn = meanNucl(c, lim)
    mc = meanCyt(c, lim)
    # remplit le tableau
    w = cond[:] # ce q'on va écrire dans le tableau
    w.extend([l, mn, mc])
    writer.writerow(w)

```

Fonctions utilisées (Functions.py)

```

#!/usr/bin/python
# coding: utf8

import os
import csv
import numpy as np

def listAllFiles(path):
    '''
    Lists all the files in a folder (your data files)

```

```

'''
f = []
for (dirpath, dirnames, filenames) in os.walk(path):
    f.extend(filenames)
    break
files = []
for fil in f:
    if not(fil[0]=='.''):
        files.append(path+'/'+fil)
return files

def checkExists(path):
    '''
    if the folder (Out) does not exists, creates it
    '''
    if not(os.path.isdir(path)):
        os.makedirs(path)

def initialize(fileOut):
    f = open(fileOut, "wb")
    writer = csv.writer(f, delimiter=';', quotechar='')
    entete = ['date', 'type cellulaire', 'proteine', 'PMA',
    'dox', 'taille Noyau', 'signal Noyau', 'signal Cytoplasme']
    writer.writerow(entete)
    return writer

def readFile(filename):
    '''
    Reads your csv file:
    The input is the name of the file
    The output is a list of lists:
    l[i] = cell i
    l[i][0] = column X0
    l[i][1] = column Y0
    l[i][2] = column Y2

```

```

'''
print('Reading the file '+filename.split('/')[-1])
data= []
with open(filename, 'rU') as csvfile:
    csvreader = csv.reader(csvfile, delimiter=';',dialect=csv.excel_tab)
    for row in csvreader:
        # reads each row one by one
        if 'ell' in row[0]:
            # marche si tu écris 'Cellule' ou 'cellule' ou 'Cell' ou 'cell',
            # et ne devrait pas apparaitre autre part
            # c'est une nouvelle cellule, j'ajoute une case
            print(row)
            data.append([[[]],[[]],[[]])
        elif 'X0' in row[0]:
            pass
        else:
            # on a des données
            data[-1][0].append(float(row[0]))
            data[-1][1].append(float(row[1]))
            data[-1][2].append(float(row[2]))
    return data

def extractInfo(filename):
    f = filename.split('/')[-1]
    f = f[:-4]
    f = f.split('_')
    f2 = []
    for s in f:
        if s[0] in ['+', '-']:
            s = ""+s
        f2.append(s)
    return f2

def limits(c):

```

```

'''
Finds the limits (indexes of the values in the lists)
limits of the cytoplasm : > 10 in Y1 (in c[2])
limits of the nucleus : > 20 in Y0 (in c[1])
At least 3 values for each case
Returns [lc1, ln1, ln2, lc2] (limit cytoplasm = lc, limit nucleus = ln)
'''

limN = 20
nn = 6
limC = 10
nc = 1
ln1 = limit(c[1],limN, nn, deb=True) # on part du début
ln2 = limit(c[1],limN, nn,deb=False) # on part de la fin
lc1 = limit(c[2],limC, nc,deb=True)
lc2 = limit(c[2],limC, nc,deb=False)

# check if the signal to detect the cytoplasm was not too low
# -> if so, the limits are the extremes of the line
if lc1>ln1: lc1 = 0
if lc2<ln2: lc2 = len(c[0])
lim = [lc1, ln1, ln2, lc2]
return lim

def limit(l, lim, nn, deb):
    i = 0
    if not(deb): i=len(l)-1
    il = None
    n = 0
    try:
        while n<nn:
            if l[i]>lim:
                if n == 0: il = i
                n+=1
            else:
                n=0
            if deb: i+=1

```

```

        else: i-=1
except:
    if deb: il=0
    else: il=len(l)
return il

def lengthNucl(c, lim):
    '''
    c[0] carries position information
    lim[1] and lim[2] are the limits of the nucleus
    '''
    return round(c[0][lim[2]]-c[0][lim[1]],4)

def meanNucl(c, lim):
    '''
    Returns the mean of signal (in c[2]) of the inside of the nucleus
    '''
    d = c[2][lim[1):(lim[2]+1)]
    return round(np.mean(d),4)

def meanCyt(c, lim):
    '''
    Returns the mean of signal (in c[2]) of the inside of the cytoplasm
    (in 2 parts)
    '''
    d = c[2][lim[0]:lim[1]]
    d.extend(c[2][(lim[2]+1):(lim[3]+1)])
    return round(np.mean(d),4)

```

Programme d'analyse (analyse.r)

```

#!/usr/bin/Rscript
#First, read the datafile

path <- '/Users/mdumond/Desktop/Mathilde/Data'

```

```

filename <- paste(path, '/Out/summary.csv', sep='')
data <- read.table(filename, header=TRUE, sep=";", quote='')

# 1. Does the date have an influence on the experiment outputs?

# Make a new column which differentiates each kind of experiment

cond <- c()
for (i in 1:dim(data)[1]){
  cond <- c(cond, paste(data[i,2], data[i,3], data[i,4], data[i,5], sep='_'))
}
data <- cbind(data, cond)

#Only the conditions appearing in several dates can be tested:
toTestExpe <- c()
allExpe <- unique(data[,9])
for (i in 1:length(allExpe)){
  print(paste('The condition: ', allExpe[i], ' was done '
, toString(length(unique(data[data[,9]==allExpe[i],1]))), ' time(s).', sep=''))
  # for loop with values taken in the experiments labels
  if(length(unique(data[data[,9]==allExpe[i],1]))>1){
    toTestExpe <- c(toTestExpe, allExpe[i])
  }
}

# Then, for each condition retained, we will do an ANOVA to test
whether the date of the experiment influences the results

# * on nuclei sizes
if(length(toTestExpe)>1){
  for (i in 1:length(toTestExpe)){
    subdata <- data[data[,9]==toTestExpe[i],]
    res <- lm(subdata[,6]~subdata[,1])
    if (summary(res)$coefficients[,4] > 0.05){
      print(paste('The experiment ', toTestExpe[i], ' was not different between the dates.'))
    } else {

```

```

    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i], ' was different
    between the dates (p-value: ',summary(res)$coefficients[,4],')',sep=''))}
  }}

# * on absolute nuclei signal
if(length(toTestExpe)>1){
for (i in 1:length(toTestExpe)){
  subdata <- data[data[,9]==toTestExpe[i],]
  res <- lm(subdata[,7]~subdata[,1])
  if (summary(res)$coefficients[,4] > 0.05){
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i], ' was not different between the dates.'))
  } else {
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i],
    ' was different between the dates (p-value: ',summary(res)$coefficients[,4],')',sep=''))}
  }}

# * on absolute cytoplasm signal
if(length(toTestExpe)>1){
for (i in 1:length(toTestExpe)){
  subdata <- data[data[,9]==toTestExpe[i],]
  res <- lm(subdata[,8]~subdata[,1])
  if (summary(res)$coefficients[,4] > 0.05){
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i], ' was not different between the dates.'))
  } else {
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i],
    ' was different between the dates (p-value: ',summary(res)$coefficients[,4],')',sep=''))}
  }}

# * on the ratio between the signals
if(length(toTestExpe)>1){
for (i in 1:length(toTestExpe)){
  subdata <- data[data[,9]==toTestExpe[i],]
  res <- lm((subdata[,7]/subdata[,8])~subdata[,1])
  if (summary(res)$coefficients[,4] > 0.05){
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i], ' was not different between the dates.'))
  } else {
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i],

```

```

    ' was different between the dates (p-value: ',summary(res)$coefficients[,4],')',sep='')})
}}
# * on the difference between the signals
if(length(toTestExpe)>1){
for (i in 1:length(toTestExpe)){
  subdata <- data[data[,9]==toTestExpe[i],]
  res <- lm((subdata[,7]-subdata[,8])~subdata[,1])
  if (summary(res)$coefficients[,4] > 0.05){
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i],' was not different between the dates.'))
  } else {
    print(paste('The experiment ', toTestExpe[i],
    ' was different between the dates (p-value: ',summary(res)$coefficients[,4],')',sep='')})
  }}
}}

# Taking the control (-dox) into account?

# 2. Does the protein localisation depends on: the protein? the PMA addition?

```


Bibliographie

- [Aguiar et al., 2008] Aguiar, R. S., Lovsin, N., Tanuri, A. and Peterlin, B. M. (2008). Vpr.A3A Chimera Inhibits HIV Replication. *Journal of Biological Chemistry* 283, 2518–2525.
- [Ahasan et al., 2015] Ahasan, M. M., Wakae, K., Wang, Z., Kitamura, K., Liu, G., Koura, M., Imayasu, M., Sakamoto, N., Hanaoka, K., Nakamura, M., Kyo, S., Kondo, S., Fujiwara, H., Yoshizaki, T., Mori, S., Kukimoto, I. and Muramatsu, M. (2015). {APOBEC3A} and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457, 295 – 299.
- [Ahn, 2016] Ahn, J. (2016). Functional organization of human SAMHD1 and mechanisms of HIV-1 restriction. *Biological chemistry* 397, 373–379.
- [Alkhatib et al., 1996] Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. (1996). CC CKR5 : A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* 272, 1955–1958.
- [Altfeld and Gale Jr, 2015] Altfeld, M. and Gale Jr, M. (2015). Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol* 16, 554–562.
- [Álvarez et al., 2009] Álvarez, M., Matamoros, T. and Menéndez-Arias, L. (2009). Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. *Journal of molecular biology* 392, 872–884.
- [Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013] Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y., Lee, J., Shi, M., Huang, I.-C., Farzan, M. and Jung, J. (2013). The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry. *Cell Host & Microbe* 13, 452–464.
- [Anrather et al., 2006] Anrather, J., Racchumi, G. and Iadecola, C. (2006). NF-KB Regulates Phagocytic NADPH Oxidase by Inducing the Expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5657–5667.
- [Anwar et al., 2013] Anwar, F., Davenport, M. P. and Ebrahimi, D. (2013). Footprint of APOBEC3 on the Genome of Human Retroelements. *Journal of Virology* 87, 8195–8204.

- [Apolonia et al., 2015] Apolonia, L., Schulz, R., Curk, T., Rocha, P., Swanson, C. M., Schaller, T., Ule, J. and Malim, M. H. (2015). Promiscuous RNA Binding Ensures Effective Encapsidation of APOBEC3 Proteins by HIV-1. *PLOS Pathogens* *11*, 1–22.
- [Arfi et al., 2009] Arfi, V., Lienard, J., Nguyen, X.-N., Berger, G., Rigal, D., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2009). Characterization of the Behavior of Functional Viral Genomes during the Early Steps of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology* *83*, 7524–7535.
- [Arfi et al., 2008] Arfi, V., Rivière, L., Jarrosson-Wuillème, L., Goujon, C., Rigal, D., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2008). Characterization of the Early Steps of Infection of Primary Blood Monocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* *82*, 6557–6565.
- [Arhel et al., 2007] Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.-C., Allen, T. D. and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO Journal* *26*, 3025–3037.
- [Arnold et al., 2001] Arnold, R. S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A. M., Sun, C. Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., Petros, J. A. and Lambeth, J. D. (2001). Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 5550–5555.
- [Aydin et al., 2014] Aydin, H., Taylor, M. and Lee, J. (2014). Structure-Guided Analysis of the Human APOBEC3-HIV Restrictome. *Structure* *22*, 668 – 684.
- [Aynaud et al., 2012] Aynaud, M.-M., Suspène, R., Vidalain, P.-O., Mussil, B., Guétard, D., Tangy, F., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J.-P. (2012). Human Tribbles 3 Protects Nuclear DNA from Cytidine Deamination by APOBEC3A. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 39182–39192.
- [Bailey et al., 2013] Bailey, C. C., Kondur, H. R., Huang, I.-C. and Farzan, M. (2013). Interferon-induced Transmembrane Protein 3 Is a Type II Transmembrane Protein. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 32184–32193.
- [Balkwill and Mantovani, 2001] Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer : back to Virchow ? *The Lancet* *357*, 539 – 545.
- [Barré-Sinoussi et al., 1983] Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* *220*, 868.
- [Barré-Sinoussi et al., 2013] Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future : 30 years of HIV research. *Nat Rev Micro* *11*, 877–883.

- [Barton and Medzhitov, 2002] Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 14943–14945.
- [Barzilai and Yamamoto, 2004] Barzilai, A. and Yamamoto, K.-I. (2004). {DNA} damage responses to oxidative stress. *{DNA} Repair* *3*, 1109 – 1115.
- [Baxter et al., 2014] Baxter, A., Russell, R., Duncan, C., Moore, M., Willberg, C., Pablos, J., Finzi, A., Kaufmann, D., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Groot, F. and Sattentau, Q. (2014). Macrophage Infection via Selective Capture of HIV-1-Infected CD4+ T Cells. *Cell Host & Microbe* *16*, 711 – 721.
- [Beggel et al., 2013] Beggel, B., Munk, C., Daumer, M., Hauck, K., Haussinger, D., Lengauer, T. and Erhardt, A. (2013). Full genome ultra-deep pyrosequencing associates G-to-A hypermutation of the hepatitis B virus genome with the natural progression of hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis* *20*, 882–889.
- [Beignon et al., 2005] Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D. and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of Clinical Investigation* *115*, 3265–3275.
- [Bello et al., 2009] Bello, G., Velasco-de Castro, C. A., Bongertz, V., Rodrigues, C. A. S., Giacoia-Gripp, C. B., Pilotto, J. H., Grinsztejn, B., Veloso, V. G. and Morgado, M. G. (2009). Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *Journal of Medical Virology* *81*, 1681–1690.
- [Beloglazova et al., 2013] Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B. and Yakunin, A. F. (2013). Nuclease Activity of the Human SAMHD1 Protein Implicated in the Aicardi-Goutières Syndrome and HIV-1 Restriction. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 8101–8110.
- [Bennett et al., 2008] Bennett, R. P., Presnyak, V., Wedekind, J. E. and Smith, H. C. (2008). Nuclear Exclusion of the HIV-1 Host Defense Factor APOBEC3G Requires a Novel Cytoplasmic Retention Signal and Is Not Dependent on RNA Binding. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 7320–7327.
- [Berger et al., 2010] Berger, A., Munk, C., Schweizer, M., Cichutek, K., Schule, S. and Flory, E. (2010). Interaction of Vpx and Apolipoprotein B mRNA-editing Catalytic Polypeptide 3 Family Member A (APOBEC3A) Correlates with Efficient Lentivirus Infection of Monocytes. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 12248–12254.
- [Berger et al., 2011a] Berger, A., Sommer, A. F. R., Zwarg, J., Hamdorf, M., Welzel, K., Esly, N., Panitz, S., Reuter, A., Ramos, I., Jatiani, A., Mulder, L. C. F., Fernandez-Sesma, A., Rutsch, F.,

- Simon, V., Konig, R. and Flory, E. (2011a). SAMHD1-Deficient CD14⁺ Cells from Individuals with Aicardi-Goutières Syndrome Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection. *PLOS Pathogens* *7*, 1–12.
- [Berger et al., 2011b] Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X.-N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2011b). APOBEC3A Is a Specific Inhibitor of the Early Phases of HIV-1 Infection in Myeloid Cells. *PLoS Pathogens* *7*, e1002221.
- [Berger et al., 2011c] Berger, G., Durand, S., Goujon, C., Nguyen, X.-N., Cordeil, S., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2011c). A simple, versatile and efficient method to genetically modify human monocyte-derived dendritic cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Nat. Protocols* *6*, 806–816.
- [Bhattacharya et al., 2013] Bhattacharya, S., HuangFu, W.-C., Dong, G., Qian, J., Baker, D. P., Karar, J., Koumenis, C., Diehl, J. A. and Fuchs, S. Y. (2013). Anti-tumorigenic effects of Type 1 interferon are subdued by integrated stress responses. *Oncogene* *32*, 4214–4221.
- [Biberfeld et al., 1985] Biberfeld, P., Porwit-Ksiazek, A., Böttiger, B., Morfeldt-Månsson, L. and Biberfeld, G. (1985). Immunohistopathology of Lymph Nodes in HLTV-III Infected Homosexuals with Persistent Adenopathy or AIDS. *Cancer Research* *45*, 4665s–4670s.
- [Bishop et al., 2004] Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S.-J. and Malim, M. H. (2004). Cytidine Deamination of Retroviral {DNA} by Diverse {APOBEC} Proteins. *Current Biology* *14*, 1392 – 1396.
- [Bode et al., 2016] Bode, C., Fox, M., Tewary, P., Steinhagen, A., Ellerkmann, R. K., Klinman, D., Baumgarten, G., Hornung, V. and Steinhagen, F. (2016). Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA via the cGAS-STING signaling pathway. *European Journal of Immunology* *46*, 1615–1621.
- [Bogani et al., 2010] Bogani, F., Corredeira, I., Fernandez, V., Sattler, U., Rutvisuttinunt, W., Defais, M. and Boehmer, P. E. (2010). Association between the Herpes Simplex Virus-1 DNA Polymerase and Uracil DNA Glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 27664–27672.
- [Bogerd et al., 2006] Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K. and Cullen, B. R. (2006). APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Research* *34*, 89.
- [Bohn et al., 2013] Bohn, M.-F., Shandilya, S., Albin, J., Kouno, T., Anderson, B., McDougale, R., Carpenter, M., Rathore, A., Evans, L., Davis, A., Zhang, J., Lu, Y., Somasundaran, M., Matsuo, H., Harris, R. and Schiffer, C. (2013). Crystal Structure of the {DNA} Cytosine Deaminase APOBEC3F : The Catalytically Active and HIV-1 Vif-Binding Domain. *Structure* *21*, 1042 – 1050.
- [Bohn et al., 2015] Bohn, M.-F., Shandilya, S., Silvas, T., Nalivaika, E., Kouno, T., Kelch, B., Ryder, S., Kurt-Yilmaz, N., Somasundaran, M. and Schiffer, C. (2015). The ssDNA Mutator {APOBEC3A} Is Regulated by Cooperative Dimerization. *Structure* *23*, 903 – 911.

- [Borrow et al., 1994] Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. and Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* *68*, 6103–6110.
- [Brachova et al., 2017] Brachova, P., Alvarez, N. S., Voorhis, B. J. V. and Christenson, L. K. (2017). Cytidine deaminase Apobec3a induction in fallopian epithelium after exposure to follicular fluid. *Gynecologic Oncology* , –.
- [Brandariz-Nuñez et al., 2012] Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J., White, T. E., Laguette, N., Benkirane, M., Brojatsch, J. and Diaz-Griffero, F. (2012). Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* *9*, 49.
- [Brandenberg et al., 2015] Brandenberg, O. F., Magnus, C., Regoes, R. R. and Trkola, A. (2015). The HIV-1 Entry Process : A Stoichiometric View. *Trends in Microbiology* *23*, 763 – 774.
- [Brasey et al., 2003] Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L. and Sonenberg, N. (2003). The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G(2)/M Phase of the Cell Cycle. *Journal of Virology* *77*, 3939–3949.
- [Brass et al., 2008] Brass, A. L., Dykxhoorn, D. M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R. J., Lieberman, J. and Elledge, S. J. (2008). Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. *Science* *319*, 921–926.
- [Brass et al., 2009] Brass, A. L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D. J., Xavier, R. J., Farzan, M. and Elledge, S. J. (2009). The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus. *Cell* *139*, 1243–1254.
- [Brenchley et al., 2004] Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T. and Douek, D. C. (2004). CD4⁺ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine* *200*, 749–759.
- [Brenner et al., 2015] Brenner, D., Blaser, H. and Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling : live or let die. *Nat Rev Immunol* *15*, 362–374.
- [Briggs et al., 2006] Briggs, J. A., Grunewald, K., Glass, B., Forster, F., Krausslich, H.-G. and Fuller, S. D. (2006). The Mechanism of HIV-1 Core Assembly : Insights from Three-Dimensional Reconstructions of Authentic Virions. *Structure* *14*, 15 – 20.
- [Briggs et al., 2009] Briggs, J. A. G., Riches, J. D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G. and Krausslich, H.-G. (2009). Structure and assembly of immature HIV. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 11090–11095.

- [Brugger et al., 2006] Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T. and Krausslich, H.-G. (2006). The HIV lipidome : A raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 2641–2646.
- [Buckman et al., 2003] Buckman, J. S., Bosche, W. J. and Gorelick, R. J. (2003). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Zn²⁺ Fingers Are Required for Efficient Reverse Transcription, Initial Integration Processes, and Protection of Newly Synthesized Viral DNA. *Journal of Virology* *77*, 1469–1480.
- [Bulua et al., 2011] Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K.-Y., Sack, M. N., Kastner, D. L. and Siegel, R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *The Journal of Experimental Medicine* *208*, 519–533.
- [Burns et al., 2013a] Burns, M. B., Lackey, L., Carpenter, M. A., Rathore, A., Land, A. M., Leonard, B., Refsland, E. W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J. B., Yee, D., Temiz, N. A., Donohue, D. E., McDougle, R. M., Brown, W. L., Law, E. K. and Harris, R. S. (2013a). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* *494*, 366–370.
- [Burns et al., 2013b] Burns, M. B., Temiz, N. A. and Harris, R. S. (2013b). Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* *45*, 977–983.
- [Bushman et al., 2009] Bushman, F. D., Malani, N., Fernandes, J., D’Orso, I., Cagney, G., Diamond, T. L., Zhou, H., Hazuda, D. J., Espeseth, A. S., Konig, R., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Goff, S. P., Krogan, N. J., Frankel, A. D., Young, J. A. T. and Chanda, S. K. (2009). Host Cell Factors in HIV Replication : Meta-Analysis of Genome-Wide Studies. *PLOS Pathogens* *5*, 1–12.
- [Buzon et al., 2010] Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M. M. and Weissenhorn, W. (2010). Crystal Structure of HIV-1 gp41 Including Both Fusion Peptide and Membrane Proximal External Regions. *PLOS Pathogens* *6*, 1–7.
- [Byeon et al., 2013] Byeon, I.-J. L., Ahn, J., Mitra, M., Byeon, C.-H., Hercik, K., Hritz, J., Charlton, L. M., Levin, J. G. and Gronenborn, A. M. (2013). NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity. *Nature Communications* *4*, 1890.
- [Campbell and Hope, 2015] Campbell, E. M. and Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid : the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Micro* *13*, 471–483.
- [Carlson et al., 2010] Carlson, L.-A., de Marco, A., Oberwinkler, H., Habermann, A., Briggs, J. A. G., Krausslich, H.-G. and Grunewald, K. (2010). Cryo Electron Tomography of Native HIV-1 Budding Sites. *PLOS Pathogens* *6*, 1–11.
- [Carlton and Martin-Serrano, 2007] Carlton, J. G. and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding : A Role for the ESCRT Machinery. *Science* *316*, 1908–1912.

- [Carpenter et al., 2012] Carpenter, M. A., Li, M., Rathore, A., Lackey, L., Law, E. K., Land, A. M., Leonard, B., Shandilya, S. M. D., Bohn, M.-F., Schiffer, C. A., Brown, W. L. and Harris, R. S. (2012). Methylcytosine and Normal Cytosine Deamination by the Foreign DNA Restriction Enzyme APOBEC3A. *Journal of Biological Chemistry* 287, 34801–34808.
- [Carpenter et al., 2010] Carpenter, M. A., Rajagurubandara, E., Wijesinghe, P. and Bhagwat, A. S. (2010). Determinants of sequence-specificity within human {AID} and {APOBEC3G}. {DNA} Repair 9, 579 – 587.
- [Carter et al., 2011] Carter, G. C., Bernstone, L., Baskaran, D. and James, W. (2011). HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1. *Virology* 409, 234 – 250.
- [Castelló et al., 2009] Castelló, A., Franco, D., Moral-López, P., Berlanga, J. J., Álvarez, E., Wimmer, E. and Carrasco, L. (2009). HIV-1 Protease Inhibits Cap- and Poly(A)-Dependent Translation upon eIF4GI and PABP Cleavage. *PLOS ONE* 4, 1–11.
- [Caval et al., 2014a] Caval, V., Suspène, R., Shapira, M., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S. (2014a). A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. *Nature Communications* 5, 5129.
- [Caval et al., 2014b] Caval, V., Suspène, R., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S. (2014b). Orthologous Mammalian APOBEC3A Cytidine Deaminases Hypermutate Nuclear DNA. *Molecular Biology and Evolution* 31, 330.
- [Center for Disease Control Task Force, 1982] Center for Disease Control Task Force, m. (1982). Epidemiologic Aspects of the Current Outbreak of Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections. *New England Journal of Medicine* 306, 248–252.
- [Chaipan et al., 2013] Chaipan, C., Smith, J. L., Hu, W.-S. and Pathak, V. K. (2013). APOBEC3G Restricts HIV-1 to a Greater Extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in Human Primary CD4+ T Cells and Macrophages. *Journal of Virology* 87, 444–453.
- [Chamulitrat et al., 2003] Chamulitrat, W., Schmidt, R., Tomakidi, P., Stremmel, W., Chunglok, W., Kawahara, T. and Rokutan, K. (2003). Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene* 22, 6045–6053.
- [Chan et al., 1997] Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263–273.
- [Chan et al., 2013] Chan, K., Resnick, M. A. and Gordenin, D. A. (2013). The choice of nucleotide inserted opposite abasic sites formed within chromosomal {DNA} reveals the polymerase activities participating in translesion {DNA} synthesis. {DNA} Repair 12, 878 – 889.

- [Chan et al., 2015] Chan, K., Roberts, S. A., Klimczak, L. J., Sterling, J. F., Saini, N., Malc, E. P., Kim, J., Kwiatkowski, D. J., Fargo, D. C., Mieczkowski, P. A., Getz, G. and Gordenin, D. A. (2015). An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. *Nature Genetics* *47*, 1067–1072.
- [Checkley et al., 2011] Checkley, M. A., Lutge, B. G. and Freed, E. O. (2011). HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *Journal of Molecular Biology* *410*, 582 – 608.
- [Chelbi-Alix and Wietzerbin, 2007] Chelbi-Alix, M. K. and Wietzerbin, J. (2007). Interferon, a growing cytokine family : 50 years of interferon research. *Biochimie* *89*, 713 – 718.
- [Chen et al., 2006] Chen, H., Lilley, C. E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N. R. and Weitzman, M. D. (2006). {APOBEC3A} Is a Potent Inhibitor of Adeno-Associated Virus and Retrotransposons. *Current Biology* *16*, 480 – 485.
- [Chen et al., 2017] Chen, K., Liu, J. and Cao, X. (2017). Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation : A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* , –.
- [Chen et al., 2004] Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J. A., Mansky, L. M. and Benichou, S. (2004). Vpr-mediated Incorporation of UNG2 into HIV-1 Particles Is Required to Modulate the Virus Mutation Rate and for Replication in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 28419–28425.
- [Chen et al., 1987] Chen, S., Habib, G., Yang, C., Gu, Z., Lee, B., Weng, S., Silberman, S., Cai, S., Deslypere, J., Rosseneu, M., Gotto, A., Li, W.-H. and Chan, L. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* *238*, 363–366.
- [Chen et al., 2015] Chen, S., Li, X., Qin, J., Chen, Y., Liu, L., Zhang, D., Wang, M., Wang, M. and Zhang, D. (2015). APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* *8*, 10548–10557.
- [Cherepanov et al., 2003] Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z. (2003). HIV-1 Integrase Forms Stable Tetramers and Associates with LEDGF/p75 Protein in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 372–381.
- [Chertova et al., 2002] Chertova, E., Bess, J. W., Crise, B. J., Sowder II, R. C., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., Hoxie, J. A., Benveniste, R. E., Lifson, J. D., Henderson, L. E. and Arthur, L. O. (2002). Envelope Glycoprotein Incorporation, Not Shedding of Surface Envelope Glycoprotein (gp120/SU), Is the Primary Determinant of SU Content of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology* *76*, 5315–5325.

- [Chesarino et al., 2014] Chesarino, N. M., McMichael, T. M., Hach, J. C. and Yount, J. S. (2014). Phosphorylation of the Antiviral Protein Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Dually Regulates Its Endocytosis and Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 11986–11992.
- [Chiu et al., 2006] Chiu, Y.-L., Witkowska, H. E., Hall, S. C., Santiago, M., Soros, V. B., Esnault, C., Heidmann, T. and Greene, W. C. (2006). High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 15588–15593.
- [Choe et al., 1996] Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996). The β -Chemokine Receptors {CCR3} and {CCR5} Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates. *Cell* *85*, 1135 – 1148.
- [Christ et al., 2008] Christ, F., Thys, W., Rijck, J. D., Gijssbers, R., Albanese, A., Arosio, D., Emiliani, S., Rain, J.-C., Benarous, R., Cereseto, A. and Debysier, Z. (2008). Transportin-SR2 Imports {HIV} into the Nucleus. *Current Biology* *18*, 1192 – 1202.
- [Chun et al., 1995] Chun, T.-W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D. and Siliciano, R. F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells : Quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* *1*, 1284–1290.
- [Ciccia and Elledge, 2010] Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The {DNA} Damage Response : Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell* *40*, 179 – 204.
- [Clapham and McKnight, 2002] Clapham, P. R. and McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *Journal of General Virology* *83*, 1809–1829.
- [Clerzius et al., 2011] Clerzius, G., GÈlinas, J.-F. and Gatignol, A. (2011). Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Reviews in Medical Virology* *21*, 42–53.
- [Compton et al., 2014] Compton, A., Bruel, T., Porrot, F., Mallet, A., Sachse, M., Euvrard, M., Liang, C., Casartelli, N. and Schwartz, O. (2014). IFITM Proteins Incorporated into HIV-1 Virions Impair Viral Fusion and Spread. *Cell Host & Microbe* .
- [Compton et al., 2016] Compton, A. A., Roy, N., Porrot, F., Billet, A., Casartelli, N., Yount, J. S., Liang, C. and Schwartz, O. (2016). Natural mutations in IFITM3 modulate post-translational regulation and toggle antiviral specificity. *EMBO reports* *17*, 1657–1671.
- [Conticello et al., 2008] Conticello, S. G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C. and Neuberger, M. S. (2008). Interaction between Antibody-Diversification Enzyme {AID} and Spliceosome-Associated Factor {CTNNB1}. *Molecular Cell* *31*, 474 – 484.

- [Corbett et al., 2003] Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C. and Dye, C. (2003). The Growing Burden of Tuberculosis : **Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic**. *Archives of Internal Medicine* 163, 1009.
- [Cosnefroy et al., 2016] Cosnefroy, O., Murray, P. J. and Bishop, K. N. (2016). HIV-1 capsid uncoating initiates after the first strand transfer of reverse transcription. *Retrovirology* 13, 58.
- [Coussens and Werb, 2002] Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- [Cronin et al., 2005] Cronin, J., Zhang, X.-Y. and Reiser, J. (2005). Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Current gene therapy* 5, 387–398.
- [Crowe and Sonza, 2000] Crowe, S. M. and Sonza, S. (2000). HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy : a further obstacle to eradication. *Journal of Leukocyte Biology* 68, 345–350.
- [Da Silva Santos et al., 2016] Da Silva Santos, C., Tartour, K. and Cimarelli, A. (2016). A Novel Entry/Uncoating Assay Reveals the Presence of at Least Two Species of Viral Capsids During Synchronized HIV-1 Infection. *PLOS Pathogens* 12, 1–28.
- [Daugherty et al., 2008] Daugherty, M. D., D’Orso, I. and Frankel, A. D. (2008). A Solution to Limited Genomic Capacity : Using Adaptable Binding Surfaces to Assemble the Functional {HIV} Rev Oligomer on {RNA}. *Molecular Cell* 31, 824 – 834.
- [Davey et al., 1999] Davey, R. T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.-W., Metcalf, J. A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R. A., Adelsberger, J. W., Miller, K. D., Kovacs, J. A., Polis, M. A., Walker, R. E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D. S., Fauci, A. S. and Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 15109–15114.
- [Davidson et al., 1995] Davidson, N. O., Innerarity, T. L., Scott, J., Smith, H., Driscoll, D. M., Teng, B. and Chan, L. (1995). Proposed nomenclature for the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme : APOBEC-1. *RNA* 1, 3.
- [Day and Schelhaas, 2014] Day, P. M. and Schelhaas, M. (2014). Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Current Opinion in Virology* 4, 24 – 31.
- [De Iaco et al., 2013] De Iaco, A., Santoni, F., Vannier, A., Guipponi, M., Antonarakis, S. and Luban, J. (2013). TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm. *Retrovirology* 10, 20.
- [Deeks et al., 2015] Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. and Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers* 1, 15035.

- [Delebecque et al., 2006] Delebecque, F., Suspène, R., Calattini, S., Casartelli, N., SaÛb, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J.-P. and Schwartz, O. (2006). Restriction of Foamy Viruses by APOBEC Cytidine Deaminases. *Journal of Virology* *80*, 605–614.
- [Demorest et al., 2011] Demorest, Z. L., Li, M. and Harris, R. S. (2011). Phosphorylation Directly Regulates the Intrinsic DNA Cytidine Deaminase Activity of Activation-induced Deaminase and APOBEC3G Protein. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 26568–26575.
- [Deng et al., 1996] Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Marzio, P. D., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. and Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661–666.
- [Der et al., 1998] Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. G. and Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 15623–15628.
- [Derse et al., 2007] Derse, D., Hill, S. A., Princler, G., Lloyd, P. and Heidecker, G. (2007). Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 2915–2920.
- [Desai et al., 2014] Desai, T. M., Marin, M., Chin, C. R., Savidis, G., Brass, A. L. and Melikyan, G. B. (2014). IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion. *PLOS Pathogens* *10*, 1–16.
- [Descours et al., 2012] Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N. and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4⁺T-cells. *Retrovirology* *9*, 87.
- [Desimmie et al., 2014] Desimmie, B. A., Delviks-Frankenberry, K. A., Burdick, R. C., Qi, D., Izumi, T. and Pathak, V. K. (2014). Multiple {APOBEC3} Restriction Factors for HIV-1 and One Vif to Rule Them All. *Journal of Molecular Biology* *426*, 1220 – 1245.
- [Di Nunzio et al., 2012] Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., Roux, P., Shorte, S., Charneau, P., Diaz-Griffero, F. and Arhel, N. J. (2012). Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration. *PLOS ONE* *7*, 1–15.
- [Dicks et al., 2016] Dicks, M. D. J., Goujon, C., Pollpeter, D., Betancor, G., Apolonia, L., Bergeron, J. R. C. and Malim, M. H. (2016). Oligomerization Requirements for MX2-Mediated Suppression of HIV-1 Infection. *Journal of Virology* *90*, 22–32.
- [Dingwall et al., 1989] Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., Skinner, M. A. and Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein

- binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6925–6929.
- [Doehle et al., 2005] Doehle, B. P., Schäfer, A. and Cullen, B. R. (2005). Human {APOBEC3B} is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology* 339, 281 – 288.
- [Doitsh et al., 2010] Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K. G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M. L., Hebbeler, A. M. and Greene, W. C. (2010). Abortive {HIV} Infection Mediates {CD4} T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell* 143, 789 – 801.
- [Donaghy et al., 2001] Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F. and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c+ myeloid and CD11c-plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574–2576.
- [Doranz et al., 1996] Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. and Doms, R. W. (1996). A Dual-Tropic Primary HIV-1 Isolate That Uses Fusin and the β -Chemokine Receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as Fusion Cofactors. *Cell* 85, 1149 – 1158.
- [Doyle et al., 2015] Doyle, T., Goujon, C. and Malim, M. H. (2015). HIV-1 and interferons : who’s interfering with whom? *Nat Rev Micro* 13, 403–413.
- [Dragic et al., 1996] Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. and Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667–673.
- [Duggal and Emerman, 2012] Duggal, N. K. and Emerman, M. (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 687–695.
- [Embretson et al., 1993] Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K. and Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362, 359–362.
- [Espíndola et al., 2016] Espíndola, M. S., Soares, L. S., Galvão Lima, L. J., Zambuzi, F. A., Cacemiro, M. C., Brauer, V. S. and Frantz, F. G. (2016). HIV infection : focus on the innate immune cells. *Immunologic Research* 64, 1118–1132.
- [Etienne et al., 2011] Etienne, L., Nerrienet, E., LeBreton, M., Bibila, G. T., Foupouapouognigni, Y., Rousset, D., Nana, A., Djoko, C. F., Tamoufe, U., Aghokeng, A. F., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Peeters, M., Wolfe, N. D. and Ayouba, A. (2011). Characterization of a new simian immunodeficiency virus strain in a naturally infected Pan troglodytes troglodytes chimpanzee with AIDS related symptoms. *Retrovirology* 8, 4–4.

- [Fan et al., 2010] Fan, J., Ma, G., Nosaka, K., Tanabe, J., Satou, Y., Koito, A., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.-P. and Matsuoka, M. (2010). APOBEC3G Generates Nonsense Mutations in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes In Vivo. *Journal of Virology* *84*, 7278–7287.
- [Feeley et al., 2011] Feeley, E. M., Sims, J. S., John, S. P., Chin, C. R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G. D., Ryan, B. J., Donis, R. O., Elledge, S. J. and Brass, A. L. (2011). IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry. *PLOS Pathogens* *7*, 1–17.
- [Feng et al., 1996] Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996). HIV-1 Entry Co-factor : Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* *272*, 872–877.
- [Fiebig et al., 2003] Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., Heldebrant, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S. H. et al. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors : implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids* *17*, 1871–1879.
- [Fischer et al., 1995] Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattajt, L. W. and 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.
- [Fitzpatrick et al., 2010] Fitzpatrick, K., Skasko, M., Deerinck, T. J., Crum, J., Ellisman, M. H. and Guatelli, J. (2010). Direct Restriction of Virus Release and Incorporation of the Interferon-Induced Protein BST-2 into HIV-1 Particles. *PLOS Pathogens* *6*, 1–12.
- [Fomsgaard et al., 1992] Fomsgaard, A., Hirsch, V. M. and Johnson, P. R. (1992). Cloning and sequences of primate CD4 molecules : Diversity of the cellular receptor for simian immunodeficiency virus/human immunodeficiency virus. *European Journal of Immunology* *22*, 2973–2981.
- [Ford et al., 2009] Ford, E. S., Purohonen, C. E. and Sereti, I. (2009). Immunopathogenesis of Asymptomatic Chronic HIV Infection : The Calm before the Storm. *Current opinion in HIV and AIDS* *4*, 206–214.
- [Francis et al., 2016] Francis, A. C., Marin, M., Shi, J., Aiken, C. and Melikyan, G. B. (2016). Time-Resolved Imaging of Single HIV-1 Uncoating In Vitro and in Living Cells. *PLOS Pathogens* *12*, 1–28.
- [Freed, 2015] Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Micro* *13*, 484–496.
- [Fricke et al., 2013] Fricke, T., Brandariz-Nuñez, A., Wang, X., Smith, A. B. and Diaz-Griffero, F. (2013). Human Cytosolic Extracts Stabilize the HIV-1 Core. *Journal of Virology* *87*, 10587–10597.

- [Gaardbo et al., 2012] Gaardbo, J. C., Hartling, H. J., Gerstoft, J. and Nielsen, S. D. (2012). Thirty Years with HIV Infection-Nonprogression Is Still Puzzling : Lessons to Be Learned from Controllers and Long-Term Nonprogressors. *AIDS Research and Treatment* 2012, 161584.
- [Galão et al., 2014] Galão, R., Pickering, S., Curnock, R. and Neil, S. (2014). Retroviral Retention Activates a Syk-Dependent HemITAM in Human Tetherin. *Cell Host & Microbe* 16, 291 – 303.
- [Galão et al., 2012] Galão, R. P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T. and Neil, S. (2012). Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NF- κ B-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host & Microbe* 12, 633 – 644.
- [Gallo et al., 1984] Gallo, R., Salahuddin, S., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B., Palker, T., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. and et, a. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500–503.
- [Gallo et al., 2001] Gallo, S. A., Puri, A. and Blumenthal, R. (2001). HIV-1 gp41 Six-Helix Bundle Formation Occurs Rapidly after the Engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-Mediated Fusion Process. *Biochemistry* 40, 12231–12236.
- [Gamble et al., 1997] Gamble, T. R., Yoo, S., Vajdos, F. F., von Schwedler, U. K., Worthylake, D. K., Wang, H., McCutcheon, J. P., Sundquist, W. I. and Hill, C. P. (1997). Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein. *Science* 278, 849–853.
- [Gao et al., 2013] Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L. and Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* 341, 903–906.
- [Gao et al., 1999] Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436–441.
- [Garcia et al., 1989] Garcia, J. A., Harrich, D., Soultanakis, E., Wu, F., Mitsuyasu, R. and Gaynor, R. B. (1989). Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *The EMBO Journal* 8, 765–778.
- [Gartner et al., 1986a] Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D., Betts, R. and Popovic, M. (1986a). Virus isolation from and identification of htlv-iii/lav-producing cells in brain tissue from a patient with aids. *JAMA* 256, 2365–2371.
- [Gartner et al., 1986b] Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D., Kaplan, M., Gallo, R. and Popovic, M. (1986b). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233, 215–219.
- [GBD 2015 HIV Collaborators, 2016] GBD 2015 HIV Collaborators, m. (2016). Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2015 : the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet HIV* 3, e361–e387.

- [Geijtenbeek et al., 2000] Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duinhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* *100*, 587 – 597.
- [Gifford, 2012] Gifford, R. J. (2012). Viral evolution in deep time : lentiviruses and mammals. *Trends in Genetics* *28*, 89 – 100.
- [Gillick et al., 2013] Gillick, K., Pollpeter, D., Phalora, P., Kim, E.-Y., Wolinsky, S. M. and Malim, M. H. (2013). Suppression of HIV-1 Infection by APOBEC3 Proteins in Primary Human CD4+ T Cells Is Associated with Inhibition of Processive Reverse Transcription as Well as Excessive Cytidine Deamination. *Journal of Virology* *87*, 1508–1517.
- [Gilliet et al., 2008] Gilliet, M., Cao, W. and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells : sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* *8*, 594–606.
- [Go et al., 2017] Go, E. P., Ding, H., Zhang, S., Ringe, R. P., Nicely, N., Hua, D., Steinbock, R. T., Golabek, M., Alin, J., Alam, S. M., Cupo, A., Haynes, B. F., Kappes, J. C., Moore, J. P., Sodroski, J. G. and Desaire, H. (2017). A glycosylation benchmark profile for HIV-1 envelope glycoprotein production based on eleven Env trimers. *Journal of Virology* .
- [Goila-Gaur et al., 2007] Goila-Gaur, R., Khan, M. A., Miyagi, E., Kao, S. and Strebel, K. (2007). Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* *4*, 61.
- [Goldstone et al., 2011] Goldstone, D. C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J. J., Groom, H. C. T., Rice, G. I., Christodoulou, E., Walker, P. A., Kelly, G., Haire, L. F., Yap, M. W., de Carvalho, L. P. S., Stoye, J. P., Crow, Y. J., Taylor, I. A. and Webb, M. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* *480*, 379–382.
- [Goncalves et al., 2012] Goncalves, A., Karayel, E., Rice, G. I., Bennett, K. L., Crow, Y. J., Superti-Furga, G. and Burckstummer, T. (2012). SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to Aicardi-Goutières syndrome-associated mutations. *Human Mutation* *33*, 1116–1122.
- [Goonetilleke et al., 2009] Goonetilleke, N., Liu, M. K., Salazar-Gonzalez, J. F., Ferrari, G., Giorgi, E., Ganusov, V. V., Keele, B. F., Learn, G. H., Turnbull, E. L., Salazar, M. G., Weinhold, K. J., Moore, S., Letvin, N., Haynes, B. F., Cohen, M. S., Hraber, P., Bhattacharya, T., Borrow, P., Perelson, A. S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Korber, B. T. and McMichael, A. J. (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine* *206*, 1253–1272.

- [Gorry et al., 2014] Gorry, P. R., Francella, N., Lewin, S. R. and Collman, R. G. (2014). HIV-1 envelope-receptor interactions required for macrophage infection and implications for current HIV-1 cure strategies. *Journal of Leukocyte Biology* 95, 71–81.
- [Gossen and Bujard, 1992] Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5547–5551.
- [Gossen et al., 1995] Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766–1769.
- [Gottlieb et al., 1981] Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine* 305, 1425–1431.
- [Goujon et al., 2008] Goujon, C., Arfi, V., Pertel, T., Luban, J., Lienard, J., Rigal, D., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2008). Characterization of Simian Immunodeficiency Virus SIVSM/Human Immunodeficiency Virus Type 2 Vpx Function in Human Myeloid Cells. *Journal of Virology* 82, 12335–12345.
- [Goujon et al., 2013] Goujon, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C. C., Schaller, T., Hue, S., Barclay, W. S., Schulz, R. and Malim, M. H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562.
- [Goujon et al., 2007] Goujon, C., Rivière, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2007). SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* 4, 2.
- [Green et al., 2016] Green, A. M., Landry, S., Budagyan, K., Avgousti, D. C., Shalhout, S., Bhagwat, A. S. and Weitzman, M. D. (2016). APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication. *Cell Cycle* 15, 998–1008.
- [Greenhead et al., 2000] Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P. S., Laing, K. G., Griffin, G. E. and Shattock, R. J. (2000). Parameters of Human Immunodeficiency Virus Infection of Human Cervical Tissue and Inhibition by Vaginal Virucides. *Journal of Virology* 74, 5577–5586.
- [Gruosso et al., 2016] Gruosso, T., Mieulet, V., Cardon, M., Bourachot, B., Kieffer, Y., Devun, F., Dubois, T., Dutreix, M., Vincent-Salomon, A., Miller, K. M. and Mechta-Grigoriou, F. (2016). Chronic oxidative stress promotes H2AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. *EMBO Molecular Medicine* 8, 527–549.
- [Gu et al., 2016] Gu, J., Chen, Q., Xiao, X., Ito, F., Wolfe, A. and Chen, X. S. (2016). Biochemical Characterization of {APOBEC3H} Variants : Implications for Their HIV-1 Restriction Activity and mC Modification. *Journal of Molecular Biology* 428, 4626 – 4638.

- [Guan et al., 2012] Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjosé, S., Franceschi, S. and Clifford, G. M. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women : A meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer* *131*, 2349–2359.
- [Gupta et al., 2009] Gupta, R. K., Mlcochova, P., Pelchen-Matthews, A., Petit, S. J., Mattiuzzo, G., Pillay, D., Takeuchi, Y., Marsh, M. and Towers, G. J. (2009). Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 20889–20894.
- [Hahn et al., 2000] Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., and Sharp, P. M. (2000). AIDS as a Zoonosis : Scientific and Public Health Implications. *Science* *287*, 607–614.
- [Haller et al., 2015] Haller, O., Staeheli, P., Schwemmler, M. and Kochs, G. (2015). Mx GTPases : dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends in Microbiology* *23*, 154 – 163.
- [Hammonds et al., 2010] Hammonds, J., Wang, J.-J., Yi, H. and Spearman, P. (2010). Immunoelectron Microscopic Evidence for Tetherin/BST2 as the Physical Bridge between HIV-1 Virions and the Plasma Membrane. *PLOS Pathogens* *6*, 1–11.
- [Hansen et al., 2014] Hansen, E. C., Seamon, K. J., Cravens, S. L. and Stivers, J. T. (2014). GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E1843–E1851.
- [Haradhvala et al., 2016] Haradhvala, N., Polak, P., Stojanov, P., Covington, K., Shinbrot, E., Hess, J. M., Rheinbay, E., Kim, J., Maruvka, Y. E., Braunstein, L., Kamburov, A., Hanawalt, P., Wheeler, D., Koren, A., Lawrence, M. and Getz, G. (2016). Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of {DNA} Damage and Repair. *Cell* *164*, 538 – 549.
- [Hare et al., 2010] Hare, S., Gupta, S. S., Valkov, E., Engelman, A. and Cherepanov, P. (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* *464*, 232–236.
- [Harjes et al., 2013] Harjes, S., Solomon, W. C., Li, M., Chen, K.-M., Harjes, E., Harris, R. S. and Matsuo, H. (2013). Impact of H216 on the DNA Binding and Catalytic Activities of the HIV Restriction Factor APOBEC3G. *Journal of Virology* *87*, 7008–7014.
- [Harris et al., 1983] Harris, C., Small, C. B., Klein, R. S., Friedland, G. H., Moll, B., Emeson, E. E., Spigland, I. and Steigbigel, N. H. (1983). Immunodeficiency in Female Sexual Partners of Men with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine* *308*, 1181–1184.
- [Harris et al., 2003] Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S. and Malim, M. H. (2003). {DNA} Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell* *113*, 803 – 809.

- [Harris and Dudley, 2015] Harris, R. S. and Dudley, J. P. (2015). {APOBECs} and virus restriction. *Virology* 479 - 480, 131 – 145.
- [Harris et al., 2012] Harris, R. S., Hultquist, J. F. and Evans, D. T. (2012). The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Biological Chemistry* 287, 40875–40883.
- [Harris et al., 2002] Harris, R. S., Petersen-Mahrt, S. K. and Neuberger, M. S. (2002). {RNA} Editing Enzyme {APOBEC1} and Some of Its Homologs Can Act as {DNA} Mutators. *Molecular Cell* 10, 1247 – 1253.
- [Hartman et al., 2006] Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R. and Boris-Lawrie, K. (2006). RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 509–516.
- [Hatzioannou and Bieniasz, 2011] Hatzioannou, T. and Bieniasz, P. D. (2011). Antiretroviral Restriction Factors. *Current opinion in virology* 1, 526–532.
- [Hazenberget al., 2000] Hazenberg, M. D., Stuart, J. W. T. C., Otto, S. A., Borleffs, J. C. C., Boucher, C. A. B., de Boer, R. J., Miedema, F. and Hamann, D. (2000). T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation : a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95, 249–255.
- [Henderson and Percipalle, 1997] Henderson, B. R. and Percipalle, P. (1997). Interactions between {HIV} rev and nuclear import and export factors : the rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin- β . *Journal of Molecular Biology* 274, 693 – 707.
- [Henderson and Fenton, 2015] Henderson, S. and Fenton, T. (2015). {APOBEC3} genes : retroviral restriction factors to cancer drivers. *Trends in Molecular Medicine* 21, 274 – 284.
- [Henry et al., 2009] Henry, M., Guétard, D., Suspène, R., Rusniok, C., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J.-P. (2009). Genetic Editing of HBV DNA by Monodomain Human APOBEC3 Cytidine Deaminases and the Recombinant Nature of APOBEC3G. *PLOS ONE* 4, 1–12.
- [Hickford et al., 2012] Hickford, D., Frankenberg, S., Shaw, G. and Renfree, M. B. (2012). Evolution of vertebrate interferon inducible transmembrane proteins. *BMC Genomics* 13, 155.
- [Hladik and McElrath, 2008] Hladik, F. and McElrath, M. J. (2008). Setting the stage : host invasion by HIV. *Nature Reviews Immunology* 8, 447–457.
- [Ho and Bieniasz, 2008] Ho, D. D. and Bieniasz, P. D. (2008). HIV-1 at 25. *Cell* 133, 561 – 565.
- [Hogue et al., 2011] Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. and Ono, A. (2011). Gag Induces the Coalescence of Clustered Lipid Rafts and Tetraspanin-Enriched Microdomains at HIV-1 Assembly Sites on the Plasma Membrane. *Journal of Virology* 85, 9749–9766.

- [Holden et al., 2008] Holden, L. G., Prochnow, C., Chang, Y. P., Bransteitter, R., Chelico, L., Sen, U., Stevens, R. C., Goodman, M. F. and Chen, X. S. (2008). Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* *456*, 121–124.
- [Holmes et al., 2007] Holmes, R. K., Malim, M. H. and Bishop, K. N. (2007). APOBEC-mediated viral restriction : not simply editing? *Trends in Biochemical Sciences* *32*, 118 – 128.
- [Holtz et al., 2013] Holtz, C. M., Sadler, H. A. and Mansky, L. M. (2013). APOBEC3G cytosine deamination hotspots are defined by both sequence context and single-stranded DNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* *41*, 6139.
- [Honjo et al., 2004] Honjo, T., Muramatsu, M. and Fagarasan, S. (2004). Aid : How does it aid antibody diversity? *Immunity* *20*, 659 – 668.
- [Hoopes et al., 2016] Hoopes, J., Cortez, L., Mertz, T., Malc, E., Mieczkowski, P. and Roberts, S. (2016). {APOBEC3A} and {APOBEC3B} Preferentially Deaminate the Lagging Strand Template during {DNA} Replication. *Cell Reports* *14*, 1273 – 1282.
- [Hrecka et al., 2011] Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S. K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M. P. and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* *474*, 658–661.
- [Hrecka et al., 2016] Hrecka, K., Hao, C., Shun, M.-C., Kaur, S., Swanson, S. K., Florens, L., Washburn, M. P. and Skowronski, J. (2016). HIV-1 and HIV-2 exhibit divergent interactions with HLTF and UNG2 DNA repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, E3921–E3930.
- [Hu and Hughes, 2012] Hu, W.-S. and Hughes, S. H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* *2*.
- [Hu and Temin, 1990] Hu, W.-S. and Temin, H. M. (1990). Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* *250*, 1227–1234.
- [Huang et al., 2015] Huang, H.-S., Chu, S.-C., Hsu, C.-F., Chen, P.-C., Ding, D.-C., Chang, M.-Y. and Chu, T.-Y. (2015). Mutagenic, surviving and tumorigenic effects of follicular fluid in the context of p53 loss : initiation of fimbria carcinogenesis. *Carcinogenesis* *36*, 1419.
- [HuangFu et al., 2012] HuangFu, W.-C., Qian, J., Liu, C., Liu, J., Lokshin, A. E., Baker, D. P., Rui, H. and Fuchs, S. Y. (2012). Inflammatory signaling compromises cell responses to interferon alpha. *Oncogene* *31*, 161–172.
- [Hughes, 2015] Hughes, S. H. (2015). Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiology Spectrum* *3*.
- [Hultquist et al., 2011] Hultquist, J. F., Lengyel, J. A., Refsland, E. W., LaRue, R. S., Lackey, L., Brown, W. L. and Harris, R. S. (2011). Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G,

- and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *Journal of Virology* *85*, 11220–11234.
- [Hurley and Hanson, 2010] Hurley, J. H. and Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery : it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 556–566.
- [Iordanskiy et al., 2006] Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F. and Bukrinsky, M. (2006). Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology* *3*, 4.
- [Isaacs and Lindenmann, 1957] Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* *147*, 258–267.
- [Isel et al., 1996] Isel, C., Lanchy, J.-M., Le Grice, S., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (1996). Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA³Lys. *The EMBO journal* *15*, 917.
- [Ivashkiv and Donlin, 2014] Ivashkiv, L. B. and Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* *14*, 36–49.
- [Iwasaki and Medzhitov, 2010] Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* *327*, 291–295.
- [Iwatani et al., 2007] Iwatani, Y., Chan, D. S., Wang, F., Maynard, K. S., Sugiura, W., Gronenborn, A. M., Rouzina, I., Williams, M. C., Musier-Forsyth, K. and Levin, J. G. (2007). Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Research* *35*, 7096.
- [Iwatani et al., 2006] Iwatani, Y., Takeuchi, H., Strebel, K. and Levin, J. G. (2006). Biochemical Activities of Highly Purified, Catalytically Active Human APOBEC3G : Correlation with Antiviral Effect. *Journal of Virology* *80*, 5992–6002.
- [Jager et al., 2011] Jager, S., Kim, D. Y., Hultquist, J. F., Shindo, K., LaRue, R. S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B. D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C. S., Harris, R. S., Gross, J. D. and Krogan, N. J. (2011). Vif hijacks CBF- β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* *481*.
- [Jaguva Vasudevan et al., 2013] Jaguva Vasudevan, A. A., Perković, M., Bulliard, Y., Cichutek, K., Trono, D., Haussinger, D. and Munk, C. (2013). Prototype Foamy Virus Bet Impairs the Dimerization and Cytosolic Solubility of Human APOBEC3G. *Journal of Virology* *87*, 9030–9040.
- [Jakobsen et al., 2013] Jakobsen, M. R., Bak, R. O., Andersen, A., Berg, R. K., Jensen, S. B., Jin, T., Laustsen, A., Hansen, K., Østergaard, L., Fitzgerald, K. A., Xiao, T. S., Mikkelsen, J. G., Mogensen,

- T. H. and Paludan, S. R. (2013). IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, E4571–E4580.
- [Janvier et al., 2011] Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J.-B., Caillet, M., Marsh, M. and Berlioz-Torrent, C. (2011). The ESCRT-0 Component HRS is Required for HIV-1 Vpu-Mediated BST-2/Tetherin Down-Regulation. *PLOS Pathogens* *7*, 1–20.
- [Jarmuz et al., 2002] Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. and Navaratnam, N. (2002). An Anthropoid-Specific Locus of Orphan C to U RNA-Editing Enzymes on Chromosome 22. *Genomics* *79*, 285 – 296.
- [Ji et al., 2013] Ji, X., Wu, Y., Yan, J., Mehrens, J., Yang, H., DeLucia, M., Hao, C., Gronenborn, A. M., Skowronski, J., Ahn, J. and Xiong, Y. (2013). Mechanism of allosteric activation of SAMHD1 by dGTP. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 1304–1309.
- [Jia et al., 2009] Jia, B., Serra-Moreno, R., Neidermyer, Jr., W., Rahmberg, A., Mackey, J., Fofana, I. B., Johnson, W. E., Westmoreland, S. and Evans, D. T. (2009). Species-Specific Activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in Overcoming Restriction by Tetherin/BST2. *PLOS Pathogens* *5*, 1–17.
- [Jia et al., 2012] Jia, R., Pan, Q., Ding, S., Rong, L., Liu, S.-L., Geng, Y., Qiao, W. and Liang, C. (2012). The N-Terminal Region of IFITM3 Modulates Its Antiviral Activity by Regulating IFITM3 Cellular Localization. *Journal of Virology* *86*, 13697–13707.
- [John et al., 2013] John, S. P., Chin, C. R., Perreira, J. M., Feeley, E. M., Aker, A. M., Savidis, G., Smith, S. E., Elia, A. E. H., Everitt, A. R., Vora, M., Pertel, T., Elledge, S. J., Kellam, P. and Brass, A. L. (2013). The CD225 Domain of IFITM3 Is Required for both IFITM Protein Association and Inhibition of Influenza A Virus and Dengue Virus Replication. *Journal of Virology* *87*, 7837–7852.
- [Jolly and Sattentau, 2005] Jolly, C. and Sattentau, Q. J. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virological Synapse Formation in T Cells Requires Lipid Raft Integrity. *Journal of Virology* *79*, 12088–12094.
- [Jones et al., 1986] Jones, K., Kadonaga, J., Luciw, P. and Tjian, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* *232*, 755–759.
- [Jønsson et al., 2017] Jønsson, K. L., Laustsen, A., Krapp, C., Skipper, K. A., Thavachelvam, K., Hotter, D., Egedal, J. H., Kjolby, M., Mohammadi, P., Prabakaran, T., Sørensen, L. K., Sun, C., Jensen, S. B., Holm, C. K., Lebbink, R. J., Johannsen, M., Nyegaard, M., Mikkelsen, J. G., Kirchhoff, F., Paludan, S. R. and Jakobsen, M. R. (2017). IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nature Communications* *8*, 14391.
- [Kaletsky et al., 2009] Kaletsky, R. L., Francica, J. R., Agrawal-Gamse, C. and Bates, P. (2009). Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 2886–2891.

- [Kane et al., 2013] Kane, M., Yadav, S. S., Bitzegeio, J., Kutluay, S. B., Zang, T., Wilson, S. J., Schoggins, J. W., Rice, C. M., Yamashita, M., Hatzioannou, T. and Bieniasz, P. D. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* *502*, 563–566.
- [Kane et al., 2016] Kane, M., Zang, T., Rihn, S., Zhang, F., Kueck, T., Alim, M., Schoggins, J., Rice, C., Wilson, S. and Bieniasz, P. (2016). Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host & Microbe* *20*, 392 – 405.
- [Kang et al., 2012] Kang, M. A., So, E.-Y., Simons, A. L., Spitz, D. R. and Ouchi, T. (2012). DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death & Disease* *3*, e249.
- [Kao et al., 1987] Kao, S.-Y., Calman, A. F., Luciw, P. A. and Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* *330*, 489–493.
- [Karn and Stoltzfus, 2012] Karn, J. and Stoltzfus, C. M. (2012). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* *2*.
- [Kawai and Akira, 2010] Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* *11*, 373–384.
- [Keele et al., 2006] Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M. and Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science* *313*, 523–526.
- [Kilareski et al., 2009] Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R. and Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* *6*, 118.
- [Kim et al., 2002] Kim, Y. K., Bourgeois, C. F., Isel, C., Churcher, M. J. and Karn, J. (2002). Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxyl-Terminal Domain by CDK9 Is Directly Responsible for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-Activated Transcriptional Elongation. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 4622–4637.
- [Kinomoto et al., 2007] Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T. and Tokunaga, K. (2007). All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Research* *35*, 2955.
- [Kitamura et al., 2012] Kitamura, S., Ode, H., Nakashima, M., Imahashi, M., Naganawa, Y., Kurosawa, T., Yokomaku, Y., Yamane, T., Watanabe, N., Suzuki, A., Sugiura, W. and Iwatani, Y. (2012). The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 1005–1010.

- [Kluge et al., 2014] Kluge, S., Mack, K., Iyer, S., Pujol, F., Heigele, A., Learn, G., Usmani, S., Sauter, D., Joas, S., Hotter, D., Bibollet-Ruche, F., Plenderleith, L., Peeters, M., Geyer, M., Sharp, P., Fackler, O., Hahn, B. and Kirchhoff, F. (2014). Nef Proteins of Epidemic HIV-1 Group O Strains Antagonize Human Tetherin. *Cell Host & Microbe* 16, 639 – 650.
- [Konig et al., 2008] Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T. L., Bonamy, G. M., Ireland, J. T., Yuan Chiang, C., Tu, B. P., Jesus, P. D. D., Lilley, C. E., Seidel, S., Opaluch, A. M., Caldwell, J. S., Weitzman, M. D., Kuhen, K. L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A. P., Miraglia, L. J., Bushman, F. D., Young, J. A. and Chanda, S. K. (2008). Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication. *Cell* 135, 49 – 60.
- [Koning et al., 2011] Koning, F. A., Goujon, C., Bauby, H. and Malim, M. H. (2011). Target Cell-Mediated Editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 Proteins in Human Macrophages. *Journal of Virology* 85, 13448–13452.
- [Koning et al., 2009] Koning, F. A., Newman, E. N. C., Kim, E.-Y., Kunstman, K. J., Wolinsky, S. M. and Malim, M. H. (2009). Defining APOBEC3 Expression Patterns in Human Tissues and Hematopoietic Cell Subsets. *Journal of Virology* 83, 9474–9485.
- [Krishnan et al., 2010] Krishnan, L., Li, X., Naraharisetty, H. L., Hare, S., Cherepanov, P. and Engelman, A. (2010). Structure-based modeling of the functional HIV-1 intasome and its inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15910–15915.
- [Kumagai and Akira, 2010] Kumagai, Y. and Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, 985–992.
- [Kupzig et al., 2003] Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A. and Banting, G. (2003). Bst-2/HM1.24 Is a Raft-Associated Apical Membrane Protein with an Unusual Topology. *Traffic* 4, 694–709.
- [Kutluay and Bieniasz, 2010] Kutluay, S. B. and Bieniasz, P. D. (2010). Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. *PLOS Pathogens* 6, 1–13.
- [Kuzembayeva et al., 2014] Kuzembayeva, M., Dilley, K., Sardo, L. and Hu, W.-S. (2014). Life of psi : How full-length HIV-1 {RNAs} become packaged genomes in the viral particles. *Virology* 454, 362 – 370.
- [Lackey et al., 2013] Lackey, L., Law, E. K., Brown, W. L. and Harris, R. S. (2013). Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination. *Cell Cycle* 12, 762–772.
- [Laguet et al., 2011] Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringard, M., Chable-Bessia, C., Segal, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O. and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.

- [Lahouassa et al., 2012] Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N. R., Kim, B. and Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13, 223–228.
- [Lambeth, 2004] Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181–189.
- [Land et al., 2013] Land, A. M., Law, E. K., Carpenter, M. A., Lackey, L., Brown, W. L. and Harris, R. S. (2013). Endogenous APOBEC3A DNA Cytosine Deaminase Is Cytoplasmic and Nongenotoxic. *Journal of Biological Chemistry* 288, 17253–17260.
- [Land et al., 2015] Land, A. M., Wang, J., Law, E. K., Aberle, R., Kirmaier, A., Krupp, A., Johnson, W. E. and Harris, R. S. (2015). Degradation of the cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B by SIV Vif. *Oncotarget* 6, 39969–39979.
- [Landry et al., 2011] Landry, S., Narvaiza, I., Linfesty, D. C. and Weitzman, M. D. (2011). APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO reports* 12, 444–450.
- [Larkin et al., 1989] Larkin, M., Childs, R. A., Matthews, T. J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A. M., Savill, J. S., Haslett, C., Diaz, R. and Feizi, T. (1989). Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS (London, England)* 3, 793–798.
- [Le Tortorec and Neil, 2009] Le Tortorec, A. and Neil, S. J. D. (2009). Antagonism to and Intracellular Sequestration of Human Tetherin by the Human Immunodeficiency Virus Type 2 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology* 83, 11966–11978.
- [Lee et al., 1999] Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D. and Doms, R. W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5215–5220.
- [Lee et al., 2010] Lee, K., Ambrose, Z., Martin, T. D., Oztop, I., Mulky, A., Julias, J. G., Vandegraaff, N., Baumann, J. G., Wang, R., Yuen, W., Takemura, T., Shelton, K., Taniuchi, I., Li, Y., Sodroski, J., Littman, D. R., Coffin, J. M., Hughes, S. H., Unutmaz, D., Engelman, A. and KewalRamani, V. N. (2010). Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1. *Cell Host & Microbe* 7, 221 – 233.
- [Leonard et al., 2013] Leonard, B., Hart, S. N., Burns, M. B., Carpenter, M. A., Temiz, N. A., Rathore, A., Vogel, R. I., Nikas, J. B., Law, E. K., Brown, W. L., Li, Y., Zhang, Y., Maurer, M. J., Oberg,

- A. L., Cunningham, J. M., Shridhar, V., Bell, D. A., April, C., Bentley, D., Bibikova, M., Cheetham, R. K., Fan, J.-B., Grocock, R., Humphray, S., Kingsbury, Z., Peden, J., Chien, J., Swisher, E. M., Hartmann, L. C., Kalli, K. R., Goode, E. L., Sicotte, H., Kaufmann, S. H. and Harris, R. S. (2013). APOBEC3B Upregulation and Genomic Mutation Patterns in Serous Ovarian Carcinoma. *Cancer Research* *73*, 7222–7231.
- [Levesque et al., 2009] Levesque, M. C., Moody, M. A., Hwang, K.-K., Marshall, D. J., Whitesides, J. F., Amos, J. D., Gurley, T. C., Allgood, S., Haynes, B. B., Vandergrift, N. A., Plonk, S., Parker, D. C., Cohen, M. S., Tomaras, G. D., Goepfert, P. A., Shaw, G. M., Schmitz, J. E., Eron, J. J., Shaheen, N. J., Hicks, C. B., Liao, H.-X., Markowitz, M., Kelsoe, G., Margolis, D. M. and Haynes, B. F. (2009). Polyclonal B Cell Differentiation and Loss of Gastrointestinal Tract Germinal Centers in the Earliest Stages of HIV-1 Infection. *PLOS Medicine* *6*, 1–19.
- [Li and De Clercq, 2016] Li, G. and De Clercq, E. (2016). HIV Genome-Wide Protein Associations : a Review of 30 Years of Research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *80*, 679–731.
- [Li et al., 2014] Li, J., Chen, Y., Li, M., Carpenter, M. A., McDougle, R. M., Luengas, E. M., Macdonald, P. J., Harris, R. S. and Mueller, J. D. (2014). {APOBEC3} Multimerization Correlates with HIV-1 Packaging and Restriction Activity in Living Cells. *Journal of Molecular Biology* *426*, 1296 – 1307.
- [Li et al., 2013] Li, K., Markosyan, R. M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J. C., Gratton, E., Cohen, F. S. and Liu, S.-L. (2013). IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLOS Pathogens* *9*, 1–18.
- [Li et al., 2012] Li, M., Kao, E., Gao, X., Sandig, H., Limmer, K., Pavon-Eternod, M., Jones, T. E., Landry, S., Pan, T., Weitzman, M. D. and David, M. (2012). Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature* *491*, 125–128.
- [Li et al., 2016] Li, Y.-L., Chandrasekaran, V., Carter, S. D., Woodward, C. L., Christensen, D. E., Dryden, K. A., Pornillos, O., Yeager, M., Ganser-Pornillos, B. K., Jensen, G. J. and Sundquist, W. I. (2016). Primate TRIM5 proteins form hexagonal nets on HIV-1 capsids. *eLife* *5*, e16269.
- [Liang et al., 2014] Liang, J.-W., Shi, Z.-Z., Shen, T.-Y., Che, X., Wang, Z., Shi, S.-S., Xu, X., Cai, Y., Zhao, P., Wang, C.-F., Zhou, Z.-X. and Wang, M.-R. (2014). Identification of Genomic Alterations in Pancreatic Cancer Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *PLOS ONE* *9*, 1–17.
- [Liao et al., 1999] Liao, W., Hong, S.-H., Chan, B. H.-J., Rudolph, F. B., Clark, S. C. and Chan, L. (1999). APOBEC-2, a Cardiac- and Skeletal Muscle-Specific Member of the Cytidine Deaminase Supergene Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *260*, 398 – 404.
- [Lightfoote et al., 1986] Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A. and Venkatesan, S. (1986). Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease

- polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Journal of Virology* *60*, 771–775.
- [Lim et al., 2012] Lim, E., Fregoso, O., McCoy, C., Matsen, F., Malik, H. and Emerman, M. (2012). The Ability of Primate Lentiviruses to Degrade the Monocyte Restriction Factor {SAMHD1} Preceded the Birth of the Viral Accessory Protein Vpx. *Cell Host & Microbe* *11*, 194 – 204.
- [Lin et al., 2013] Lin, T.-Y., Chin, C., Everitt, A., Clare, S., Ferreira, J., Savidis, G., Aker, A., John, S., Sarlah, D., Carreira, E., Elledge, S., Kellam, P. and Brass, A. (2013). Amphotericin B Increases Influenza A Virus Infection by Preventing IFITM3-Mediated Restriction. *Cell Reports* *5*, 895 – 908.
- [Lin et al., 2003] Lin, X., Irwin, D., Kanazawa, S., Huang, L., Romeo, J., Yen, T. S. B. and Peterlin, B. M. (2003). Transcriptional Profiles of Latent Human Immunodeficiency Virus in Infected Individuals : Effects of Tat on the Host and Reservoir. *Journal of Virology* *77*, 8227–8236.
- [Liu et al., 2013] Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F. and Liang, C. (2013). The Interferon-Inducible MxB Protein Inhibits HIV-1 Infection. *Cell Host & Microbe* *14*, 398 – 410.
- [Llano et al., 2006] Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., Teo, W. and Poeschla, E. M. (2006). An Essential Role for LEDGF/p75 in HIV Integration. *Science* *314*, 461–464.
- [Locatelli and Peeters, 2012] Locatelli, S. and Peeters, M. (2012). Cross-species transmission of simian retroviruses : how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS* *26*, 659–673.
- [Lochelt et al., 2005] Lochelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y.-B., Truyen, U., R^sler, U., Battenberg, M., Saib, A., Flory, E., Cichutek, K. and M_{nk}, C. (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 7982–7987.
- [Logue et al., 2014] Logue, E. C., Bloch, N., Dhuey, E., Zhang, R., Cao, P., Hérate, C., Chauveau, L., Hubbard, S. R. and Landau, N. R. (2014). A DNA Sequence Recognition Loop on APOBEC3A Controls Substrate Specificity. *PLOS ONE* *9*, 1–10.
- [Long et al., 2013] Long, J., Delahanty, R. J., Li, G., Gao, Y.-T., Lu, W., Cai, Q., Xiang, Y.-B., Li, C., Ji, B.-T., Zheng, Y., Ali, S., Shu, X.-O. and Zheng, W. (2013). A Common Deletion in the APOBEC3 Genes and Breast Cancer Risk. *JNCI : Journal of the National Cancer Institute* *105*, 573.
- [Lu et al., 2011] Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S.-L. and Liang, C. (2011). The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *Journal of Virology* *85*, 2126–2137.

- [Luban, 2012] Luban, J. (2012). TRIM5 and the Regulation of HIV-1 Infectivity. *Molecular Biology International* 2012, 1–6.
- [Lucifora et al., 2014] Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M. F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., Remouchamps, C., Chou, W.-M., Thasler, W. E., Hüser, N., Durantel, D., Liang, T. J., Münk, C., Heim, M. H., Browning, J. L., Dejardin, E., Dandri, M., Schindler, M., Heikenwalder, M. and Protzer, U. (2014). Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science* 343, 1221–1228.
- [Lusic and Siliciano, 2017] Lusic, M. and Siliciano, R. F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Micro* 15, 69–82.
- [Madani and Kabat, 1998] Madani, N. and Kabat, D. (1998). An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *Journal of Virology* 72, 10251–10255.
- [Maddon et al., 1986] Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J., Clapham, P. R., Weiss, R. A. and Axel, R. (1986). The {T4} gene encodes the {AIDS} virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333 – 348.
- [Madjo et al., 2016] Madjo, U., Leymarie, O., Frémont, S., Kuster, A., Nehlich, M., Gallois-Montbrun, S., Janvier, K. and Berlioz-Torrent, C. (2016). {LC3C} Contributes to Vpu-Mediated Antagonism of BST2/Tetherin Restriction on HIV-1 Release through a Non-canonical Autophagy Pathway. *Cell Reports* 17, 2221 – 2233.
- [Madsen et al., 1999] Madsen, P., Celis, J. E., Rasmussen, H. H., Vorum, H., Anant, S., Gromov, P., Dumanski, J. P., Tommerup, N., Collins, J. E., Wright, C. L., Dunham, I. and Davidson, N. O. (1999). Psoriasis Upregulated Phorbol-1 Shares Structural but not Functional Similarity to the mRNA-Editing Protein APOBEC-1. *Journal of Investigative Dermatology* 113, 162 – 169.
- [Maertens et al., 2010] Maertens, G. N., Hare, S. and Cherepanov, P. (2010). The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature* 468, 326–329.
- [Mahiet and Swanson, 2016] Mahiet, C. and Swanson, C. M. (2016). Control of HIV-1 gene expression by SR proteins. *Biochemical Society Transactions* 44, 1417–1425.
- [Mahieux et al., 2005] Mahieux, R., Suspène, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J.-P. (2005). Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *Journal of General Virology* 86, 2489–2494.
- [Malim and Bieniasz, 2012] Malim, M. H. and Bieniasz, P. D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2.

- [Malim et al., 1989] Malim, M. H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J. V. and Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* *338*, 254–257.
- [Mallardo et al., 1996] Mallardo, M., Dragonetti, E., Baldassarre, F., Ambrosino, C., Scala, G. and Quinto, I. (1996). An NF- κ B Site in the 5'-Untranslated Leader Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhances the Viral Expression in Response to NF- κ B-activating Stimuli. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 20820–20827.
- [Mangeat et al., 2009] Mangeat, B., Gers-Huber, G., Lehmann, M., Zufferey, M., Luban, J. and Piguet, V. (2009). HIV-1 Vpu Neutralizes the Antiviral Factor Tetherin/BST-2 by Binding It and Directing Its Beta-TrCP2-Dependent Degradation. *PLOS Pathogens* *5*, 1–12.
- [Mangeat et al., 2003] Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* *424*, 99–103.
- [Mann et al., 1994] Mann, D. A., Mikaélian, I., Zimmel, R. W., Green, S. M., Lowe, A. D., Kimura, T., Singh, M., Jonathan, P., Butler, G., Gait, M. J. and Karn, J. (1994). A Molecular Rheostat : Cooperative Rev Binding to Stem I of the Rev-response Element Modulates Human Immunodeficiency Virus Type-1 Late Gene Expression. *Journal of Molecular Biology* *241*, 193 – 207.
- [Mansouri et al., 2009] Mansouri, M., Viswanathan, K., Douglas, J. L., Hines, J., Gustin, J., Moses, A. V. and Fruh, K. (2009). Molecular Mechanism of BST2/Tetherin Downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Virology* *83*, 9672–9681.
- [Marin et al., 2003] Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. and Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* *9*, 1398–1403.
- [Marino et al., 2016] Marino, D., Perkovićá, M., Hain, A., Jaguva Vasudevan, A. A., Hofmann, H., Hanschmann, K.-M., Muhlebach, M. D., Schumann, G. G., Konig, R., Cichutek, K., Haussinger, D. and Munk, C. (2016). APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. *PLOS ONE* *11*, 1–23.
- [Martin-Serrano et al., 2001] Martin-Serrano, J., Zang, T. and Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* *7*, 1313–1319.
- [Matreyek and Engelman, 2013] Matreyek, K. A. and Engelman, A. (2013). Viral and Cellular Requirements for the Nuclear Entry of Retroviral Preintegration Nucleoprotein Complexes. *Viruses* *5*, 2483–2511.
- [Matreyek et al., 2013] Matreyek, K. A., Yucel, S. S., Li, X. and Engelman, A. (2013). Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity. *PLOS Pathogens* *9*, 1–21.

- [McDougall et al., 2011] McDougall, W. M., Okany, C. and Smith, H. C. (2011). Deaminase Activity on Single-stranded DNA (ssDNA) Occurs in Vitro when APOBEC3G Cytidine Deaminase Forms Homotetramers and Higher-order Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 30655–30661.
- [McDougle et al., 2013] McDougle, R. M., Hultquist, J. F., Stabell, A. C., Sawyer, S. L. and Harris, R. S. (2013). {D316} is critical for the enzymatic activity and HIV-1 restriction potential of human and rhesus {APOBEC3B}. *Virology* 441, 31 – 39.
- [McIlroy et al., 1995] McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debré, P. and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of Virology* 69, 4737–45.
- [McKenna et al., 2005] McKenna, K., Beignon, A.-S. and Bhardwaj, N. (2005). Plasmacytoid Dendritic Cells : Linking Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Virology* 79, 17–27.
- [McMichael et al., 2010] McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. and Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection : clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10, 11–23.
- [Melikyan, 2008] Melikyan, G. B. (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion : the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 5, 111–111.
- [Mellors et al., 1996] Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. and Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* 272, 1167–1170.
- [Menéndez-Arias et al., 2016] Menéndez-Arias, L., Sebastián-Martín, A. and Álvarez, M. (2016). Viral reverse transcriptases. *Virus Research* .
- [Miele et al., 1996] Miele, G., Mouland, A., Harrison, G. P., Cohen, E. and Lever, A. M. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *Journal of Virology* 70, 944–951.
- [Mitchell et al., 2009] Mitchell, R. S., Katsura, C., Skasko, M. A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E. B., Margottin-Goguet, F., Benarous, R. and Guatelli, J. C. (2009). Vpu Antagonizes BST-2-Mediated Restriction of HIV-1 Release via β -TrCP and Endo-Lysosomal Trafficking. *PLOS Pathogens* 5, 1–16.
- [Mittal et al., 2014] Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. and Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 1126–1167.

- [Miyachi et al., 2009] Miyachi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. and Melikyan, G. B. (2009). {HIV} Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* 137, 433 – 444.
- [Mlcochova et al., 2017] Mlcochova, P., Sutherland, K. A., Watters, S. A., Bertoli, C., de Bruin, R. A., Rehwinkel, J., Neil, S. J., Lenzi, G. M., Kim, B., Khwaja, A., Gage, M. C., Georgiou, C., Chittka, A., Yona, S., Noursadeghi, M., Towers, G. J. and Gupta, R. K. (2017). A G1-like state allows HIV-1 to bypass SAMHD1 restriction in macrophages. *The EMBO Journal* 36, 604–616.
- [Modem et al., 2005] Modem, S., Badri, K. R., Holland, T. C. and Reddy, T. R. (2005). Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Research* 33, 873.
- [Moir et al., 2011] Moir, S., Chun, T.-W. and Fauci, A. S. (2011). Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology : Mechanisms of Disease* 6, 223–248.
- [Morgan and Liu, 2011] Morgan, M. J. and Liu, Z.-g. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115.
- [Morita et al., 2011] Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Hamilton, I. B. and Sundquist, W. (2011). ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host & Microbe* 9, 235 – 242.
- [Muñoz Barroso et al., 1999] Muñoz Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E. and Blumenthal, R. (1999). Role of the Membrane-Proximal Domain in the Initial Stages of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein-Mediated Membrane Fusion. *Journal of Virology* 73, 6089–6092.
- [Muckenfuss et al., 2006] Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perković, M., Lower, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G. G. and Munk, C. (2006). APOBEC3 Proteins Inhibit Human LINE-1 Retrotransposition. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22161–22172.
- [Muramatsu et al., 1999] Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. and Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18470–18476.
- [Mussil et al., 2013] Mussil, B., Suspène, R., Aynaud, M.-M., Gauvrit, A., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S. (2013). Human APOBEC3A Isoforms Translocate to the Nucleus and Induce DNA Double Strand Breaks Leading to Cell Stress and Death. *PLOS ONE* 8.
- [Nabel and Baltimore, 1987] Nabel, G. and Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326, 711–713.
- [Narvaiza et al., 2009] Narvaiza, I., Linfesty, D. C., Greener, B. N., Hakata, Y., Pintel, D. J., Logue, E., Landau, N. R. and Weitzman, M. D. (2009). Deaminase-Independent Inhibition of Parvoviruses by the APOBEC3A Cytidine Deaminase. *PLOS Pathogens* 5, 1–14.

- [Nazarov et al., 2013] Nazarov, P. V., Reinsbach, S. E., Muller, A., Nicot, N., Philippidou, D., Vallar, L. and Kreis, S. (2013). Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes : linking dynamic expression changes to function. *Nucleic Acids Research* *41*, 2817.
- [Neil et al., 2001] Neil, S., Martin, F., Ikeda, Y. and Collins, M. (2001). Postentry Restriction to Human Immunodeficiency Virus-Based Vector Transduction in Human Monocytes. *Journal of Virology* *75*, 5448–5456.
- [Neil et al., 2007] Neil, S. J., Sandrin, V., Sundquist, W. I. and Bieniasz, P. D. (2007). An Interferon- α -Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein. *Cell Host & Microbe* *2*, 193–203.
- [Neil et al., 2006] Neil, S. J. D., Eastman, S. W., Jouvenet, N. and Bieniasz, P. D. (2006). HIV-1 Vpu Promotes Release and Prevents Endocytosis of Nascent Retrovirus Particles from the Plasma Membrane. *PLOS Pathogens* *2*, 1–14.
- [Neil et al., 2008] Neil, S. J. D., Zang, T. and Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* *451*, 425–430.
- [Nguyen et al., 2015] Nguyen, X.-N., Barateau, V., Wu, N., Berger, G. and Cimarelli, A. (2015). The Frequency of Cytidine Editing of Viral DNA Is Differentially Influenced by Vpx and Nucleosides during HIV-1 or SIVMAC Infection of Dendritic Cells. *PLOS ONE* *10*, 1–13.
- [Niavarani et al., 2015] Niavarani, A., Currie, E., Rey, Y., Anjos-Afonso, F., Horswell, S., Griessinger, E., Luis Sardina, J. and Bonnet, D. (2015). APOBEC3A Is Implicated in a Novel Class of G-to-A mRNA Editing in WT1 Transcripts. *PLOS ONE* *10*, 1–17.
- [Nik-Zainal et al., 2012] Nik-Zainal, S., Alexandrov, L., Wedge, D., Van†Loo, P., Greenman, C., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L., Menzies, A., Martin, S., Leung, K., Chen, L., Leroy, C., Ramakrishna, M., Rance, R., Lau, K., Mudie, L., Varela, I., McBride, D., Bignell, G., Cooke, S., Shlien, A., Gamble, J., Whitmore, I., Maddison, M., Tarpey, P., Davies, H., Papaemmanuil, E., Stephens, P., McLaren, S., Butler, A., Teague, J., Jonsson, G., Garber, J., Silver, D., Miron, P., Fatima, A., Boyault, S., Langerød, A., Tutt, A., Martens, J., Aparicio, S., Åke Borg, Salomon, A., Thomas, G., Børresen-Dale, A.-L., Richardson, A., Neuberger, M., Futreal, P., Campbell, P. and Stratton, M. (2012). Mutational Processes Molding the Genomes of 21 Breast Cancers. *Cell* *149*, 979 – 993.
- [Nik-Zainal et al., 2014] Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Alexandrov, L. B., Petljak, M., Butler, A. P., Bolli, N., Davies, H. R., Knappskog, S., Martin, S., Papaemmanuil, E., Ramakrishna, M., Shlien, A., Simoncic, I., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Campbell, P. J. and Stratton, M. R. (2014). Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat Genet* *46*, 487–491.

- [Nikolaitchik et al., 2013] Nikolaitchik, O. A., Dilley, K. A., Fu, W., Gorelick, R. J., Tai, S.-H. S., Soheilian, F., Ptak, R. G., Nagashima, K., Pathak, V. K. and Hu, W.-S. (2013). Dimeric RNA Recognition Regulates HIV-1 Genome Packaging. *PLOS Pathogens* *9*, 1–9.
- [Nisole et al., 2004] Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J. P. and Yap, M. W. (2004). A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 13324–13328.
- [OhAinle et al., 2006] OhAinle, M., Kerns, J. A., Malik, H. S. and Emerman, M. (2006). Adaptive Evolution and Antiviral Activity of the Conserved Mammalian Cytidine Deaminase APOBEC3H. *Journal of Virology* *80*, 3853–3862.
- [Ohlmann et al., 2014] Ohlmann, T., Mengardi, C. and López-Lastra, M. (2014). Translation initiation of the HIV-1 mRNA. *Translation* *2*, e960242.
- [Okulicz et al., 2009] Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinman, G., Agan, B. K. and Dolan, M. J. (2009). Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *The Journal of Infectious Diseases* *200*, 1714.
- [Okuyama et al., 2012] Okuyama, S., Marusawa, H., Matsumoto, T., Ueda, Y., Matsumoto, Y., Endo, Y., Takai, A. and Chiba, T. (2012). Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *International Journal of Cancer* *130*, 1294–1301.
- [Ono et al., 2004] Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. and Freed, E. O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14889–14894.
- [Ono and Freed, 2004] Ono, A. and Freed, E. O. (2004). Cell-Type-Dependent Targeting of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly to the Plasma Membrane and the Multivesicular Body. *Journal of Virology* *78*, 1552–1563.
- [Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009] Ostrand-Rosenberg, S. and Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells : Linking Inflammation and Cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *182*, 4499–4506.
- [Ott, 2008] Ott, D. E. (2008). Cellular proteins detected in HIV-1. *Reviews in Medical Virology* *18*, 159–175.
- [Overbaugh and Bangham, 2001] Overbaugh, J. and Bangham, C. R. M. (2001). Selection Forces and Constraints on Retroviral Sequence Variation. *Science* *292*, 1106–1109.

- [Paludan and Bowie, 2013] Paludan, S. and Bowie, A. (2013). Immune Sensing of {DNA}. *Immunity* 38, 870 – 880.
- [Pancera et al., 2010] Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.-E. A., Chen, L., Huang, C.-c., Kong, L., Kwon, Y. D., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J. E., Schief, W. R., Sodroski, J., Wyatt, R. and Kwong, P. D. (2010). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 1166–1171.
- [Pandrea et al., 2008] Pandrea, I., Sodora, D. L., Silvestri, G. and Apetrei, C. (2008). Into the wild : simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends in Immunology* 29, 419 – 428.
- [Panté and Kann, 2002] Panté, N. and Kann, M. (2002). Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of about 39 nm. *Molecular Biology of the Cell* 13, 425–434.
- [Parkin and Bray, 2006] Parkin, D. M. and Bray, F. (2006). Chapter 2 : The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24, *Supplement 3*, S11 – S25.
- [Parkin et al., 1988] Parkin, N. T., Cohen, E. A., Darveau, A., Rosen, C., Haseltine, W. and Sonenberg, N. (1988). Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1 : effects of secondary structure on translation. *The EMBO Journal* 7, 2831–2837.
- [Patterson et al., 2001] Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J. and Gotch, F. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. *Journal of Virology* 75, 6710–6713.
- [Peng et al., 2007] Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Lei, K. J., Rangel, Z. G., Munson, P. J. and Wahl, S. M. (2007). Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393–400.
- [Peng et al., 2014] Peng, K., Muranyi, W., Glass, B., Laketa, V., Yant, S. R., Tsai, L., Cihlar, T., Muller, B. and Krausslich, H.-G. (2014). Quantitative microscopy of functional HIV post-entry complexes reveals association of replication with the viral capsid. *eLife* 3, e04114.
- [Pereira et al., 2000] Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J. and Deacon, N. J. (2000). SURVEY AND SUMMARY A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Research* 28, 663–668.
- [Perez-Caballero et al., 2009] Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M. W., Gregory, D. A., Johnson, M. C. and Bieniasz, P. D. (2009). Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell* 139, 499 – 511.

- [Perner et al., 2003] Perner, A., Andresen, L., Pedersen, G. and Rask-Madsen, J. (2003). Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut* 52, 231–236.
- [Pertel et al., 2011] Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Zuger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F. A., Uchil, P. D., Chatel, L., Bisiaux, A., Albert, M. L., Strambio-De-Castillia, C., Mothes, W., Pizzato, M., Grutter, M. G. and Luban, J. (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361–365.
- [Pestka et al., 2004] Pestka, S., Krause, C. D. and Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202, 8–32.
- [Peterlin and Price, 2006] Peterlin, B. M. and Price, D. H. (2006). Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb. *Molecular Cell* 23, 297–305.
- [Pham et al., 2013] Pham, P., Landolph, A., Mendez, C., Li, N. and Goodman, M. F. (2013). A Biochemical Analysis Linking APOBEC3A to Disparate HIV-1 Restriction and Skin Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 288, 29294–29304.
- [Plantier et al., 2009] Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Leme, V., Damond, F., Robertson, D. L. and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15, 871–872.
- [Platanias, 2005] Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386.
- [Polevoda et al., 2015a] Polevoda, B., McDougall, W. M., Tun, B. N., Cheung, M., Salter, J. D., Friedman, A. E. and Smith, H. C. (2015a). RNA binding to APOBEC3G induces the disassembly of functional deaminase complexes by displacing single-stranded DNA substrates. *Nucleic Acids Research* 43, 9434.
- [Polevoda et al., 2015b] Polevoda, B., McDougall, W. M., Tun, B. N., Cheung, M., Salter, J. D., Friedman, A. E. and Smith, H. C. (2015b). RNA binding to APOBEC3G induces the disassembly of functional deaminase complexes by displacing single-stranded DNA substrates. *Nucleic Acids Research* 43, 9434.
- [Powell et al., 2014] Powell, C., Cornblath, E. and Goldman, D. (2014). Zinc-binding Domain-dependent, Deaminase-independent Actions of Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic Polypeptide 2 (ApoBec2), Mediate Its Effect on Zebrafish Retina Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* 289, 28924–28941.
- [Powell et al., 1987] Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. and Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific {RNA} processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831 – 840.

- [Prohaska et al., 2014] Prohaska, K. M., Bennett, R. P., Salter, J. D. and Smith, H. C. (2014). The multifaceted roles of RNA binding in APOBEC cytidine deaminase functions. *Wiley Interdisciplinary Reviews : RNA* 5, 493–508.
- [Pyeon et al., 2009] Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P. and Lambert, P. F. (2009). Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLOS Pathogens* 5, 1–9.
- [Rasaiyaah et al., 2013] Rasaiyaah, J., Tan, C. P., Fletcher, A. J., Price, A. J., Blondeau, C., Hilditch, L., Jacques, D. A., Selwood, D. L., James, L. C., Noursadeghi, M. and Towers, G. J. (2013). HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature* 503, 402–405.
- [Rathore et al., 2013] Rathore, A., Carpenter, M. A., Demir, O., Ikeda, T., Li, M., Shaban, N. M., Law, E. K., Anokhin, D., Brown, W. L., Amaro, R. E. and Harris, R. S. (2013). The Local Dinucleotide Preference of {APOBEC3G} Can Be Altered from 5'-CC to 5'-TC by a Single Amino Acid Substitution. *Journal of Molecular Biology* 425, 4442 – 4454.
- [Refsland et al., 2014] Refsland, E. W., Hultquist, J. F., Luengas, E. M., Ikeda, T., Shaban, N. M., Law, E. K., Brown, W. L., Reilly, C., Emerman, M. and Harris, R. S. (2014). Natural Polymorphisms in Human APOBEC3H and HIV-1 Vif Combine in Primary T Lymphocytes to Affect Viral G-to-A Mutation Levels and Infectivity. *PLOS Genetics* 10, 1–12.
- [Refsland et al., 2010] Refsland, E. W., Stenglein, M. D., Shindo, K., Albin, J. S., Brown, W. L. and Harris, R. S. (2010). Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues : implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Research* 38, 4274.
- [Rivière et al., 2010] Rivière, L., Darlix, J.-L. and Cimarelli, A. (2010). Analysis of the Viral Elements Required in the Nuclear Import of HIV-1 DNA. *Journal of Virology* 84, 729–739.
- [Roberts et al., 2012] Roberts, S., Sterling, J., Thompson, C., Harris, S., Mav, D., Shah, R., Klimczak, L., Kryukov, G., Malc, E., Mieczkowski, P., Resnick, M. and Gordenin, D. (2012). Clustered Mutations in Yeast and in Human Cancers Can Arise from Damaged Long Single-Strand {DNA} Regions. *Molecular Cell* 46, 424 – 435.
- [Roberts and Gordenin, 2014] Roberts, S. A. and Gordenin, D. A. (2014). Hypermutation in human cancer genomes : footprints and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 14, 786–800.
- [Roberts et al., 2013] Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G. V., Carter, S. L., Saksena, G., Harris, S., Shah, R. R., Resnick, M. A., Getz, G. and Gordenin, D. A. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 45, 970–976.

- [Rogakou et al., 1998] Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 5858–5868.
- [Rogozin et al., 2005] Rogozin, I. B., Basu, M. K., Jordan, I. K., Pavlov, Y. I. and Koonin, E. V. (2005). APOBEC4, a New Member of the AID/APOBEC Family of Polynucleotide (Deoxy)Cytidine Deaminases Predicted by Computational Analysis. *Cell Cycle* *4*, 1281–1285.
- [Ryoo et al., 2014] Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.-Y., Seo, D., Kim, J., White, T. E., Brandariz-Nunez, A., Diaz-Griffero, F., Yun, C.-H., Hollenbaugh, J. A., Kim, B., Baek, D. and Ahn, K. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med* *20*, 936–941.
- [Saad et al., 2006] Saad, J. S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R. H. and Summers, M. F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 11364–11369.
- [Sagar, 2014] Sagar, M. (2014). Origin of the Transmitted Virus in HIV Infection : Infected Cells Versus Cell-Free Virus. *The Journal of Infectious Diseases* *210*, S667.
- [Salter et al., 2016] Salter, J. D., Bennett, R. P. and Smith, H. C. (2016). The {APOBEC} Protein Family : United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences* *41*, 578 – 594.
- [Sarasin-Filipowicz et al., 2009] Sarasin-Filipowicz, M., Wang, X., Yan, M., Duong, F. H. T., Poli, V., Hilton, D. J., Zhang, D.-E. and Heim, M. H. (2009). Alpha Interferon Induces Long-Lasting Refractoriness of JAK-STAT Signaling in the Mouse Liver through Induction of USP18/UBP43. *Molecular and Cellular Biology* *29*, 4841–4851.
- [Sato et al., 2014] Sato, K., Takeuchi, J. S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu, W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D. S., Pathak, V. K. and Koyanagi, Y. (2014). APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and Evolution in Humanized Mouse Model. *PLOS Pathogens* *10*, 1–15.
- [Sato et al., 2010] Sato, Y., Probst, H. C., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Neuberger, M. S. and Rada, C. (2010). Deficiency in APOBEC2 Leads to a Shift in Muscle Fiber Type, Diminished Body Mass, and Myopathy. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 7111–7118.
- [Sawyer et al., 2005] Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M. and Malik, H. S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 α identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 2832–2837.
- [Schafer et al., 2004] Schafer, A., Bogerd, H. P. and Cullen, B. R. (2004). Specific packaging of {APOBEC3G} into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* *328*, 163 – 168.

- [Schneider et al., 2008] Schneider, E., Whitmore, S., Glynn, K. M., Dominguez, K., Mitsch, A., McKenna, M. T. and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008). Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years—United States, 2008. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 57, 1–12.
- [Schneider et al., 2014] Schneider, W. M., Dittmann Chevillotte, M. and Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes : A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* 32, 513–545.
- [Schoggins, 2014] Schoggins, J. W. (2014). Interferon-stimulated genes : roles in viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 6, 40 – 46.
- [Schroder et al., 2002] Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F. (2002). HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell* 110, 521 – 529.
- [Schulte et al., 2015] Schulte, B., Buffone, C., Opp, S., Di Nunzio, F., De Souza Aranha Vieira, D. A., Brandariz-Nuñez, A. and Diaz-Griffero, F. (2015). Restriction of HIV-1 Requires the N-Terminal Region of MxB as a Capsid-Binding Motif but Not as a Nuclear Localization Signal. *Journal of Virology* 89, 8599–8610.
- [Schultz et al., 2000] Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A. and Halazonetis, T. D. (2000). P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *The Journal of Cell Biology* 151, 1381–1390.
- [Schwartz et al., 1990] Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. and Pavlakis, G. N. (1990). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of Virology* 64, 5448–5456.
- [Schwartz et al., 1992] Schwartz, S., Felber, B. K. and Pavlakis, G. N. (1992). Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 12, 207–219.
- [Seamon et al., 2015] Seamon, K. J., Sun, Z., Shlyakhtenko, L. S., Lyubchenko, Y. L. and Stivers, J. T. (2015). SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity. *Nucleic Acids Research* 43, 6486.
- [Seplyarskiy et al., 2016] Seplyarskiy, V. B., Soldatov, R. A., Popadin, K. Y., Antonarakis, S. E., Bazzykin, G. A. and Nikolaev, S. I. (2016). APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication. *Genome Research* 26, 174–182.

- [Shah et al., 2013] Shah, V. B., Shi, J., Hout, D. R., Oztop, I., Krishnan, L., Ahn, J., Shotwell, M. S., Engelman, A. and Aiken, C. (2013). The Host Proteins Transportin SR2/TNPO3 and Cyclophilin A Exert Opposing Effects on HIV-1 Uncoating. *Journal of Virology* 87, 422–432.
- [Shan et al., 2013] Shan, Z., Han, Q., Nie, J., Cao, X., Chen, Z., Yin, S., Gao, Y., Lin, F., Zhou, X., Xu, K., Fan, H., Qian, Z., Sun, B., Zhong, J., Li, B. and Tsun, A. (2013). Negative Regulation of Interferon-induced Transmembrane Protein 3 by SET7-mediated Lysine Monomethylation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35093–35103.
- [Sharma et al., 2016a] Sharma, S., Patnaik, S. K., Kemer, Z. and Baysal, B. E. (2016a). Transient overexpression of exogenous APOBEC3A causes C-to-U RNA editing of thousands of genes. *RNA Biology* 0, 1–8.
- [Sharma et al., 2016b] Sharma, S., Patnaik, S. K., Taggart, R. T. and Baysal, B. E. (2016b). The double-domain cytidine deaminase APOBEC3G is a cellular site-specific RNA editing enzyme. *Scientific Reports* 6, 39100.
- [Sharma et al., 2015] Sharma, S., Patnaik, S. K., Thomas Taggart, R., Kannisto, E. D., Enriquez, S. M., Gollnick, P. and Baysal, B. E. (2015). APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages. *Nature Communications* 6, 6881.
- [Sheehy et al., 2002] Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. and Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650.
- [Sheehy et al., 2003] Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. and Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9, 1404–1407.
- [Shi et al., 2015] Shi, K., Carpenter, M. A., Kurahashi, K., Harris, R. S. and Aihara, H. (2015). Crystal Structure of the DNA Deaminase APOBEC3B Catalytic Domain. *Journal of Biological Chemistry* 290, 28120–28130.
- [Shlyakhtenko et al., 2014] Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. J., Li, M., Harris, R. S. and Lyubchenko, Y. L. (2014). Interaction of APOBEC3A with DNA Assessed by Atomic Force Microscopy. *PLOS ONE* 9, 1–6.
- [Siliciano et al., 2003] Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., Kovacs, C., Gange, S. J. and Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9, 727–728.
- [Siliciano and Greene, 2011] Siliciano, R. F. and Greene, W. C. (2011). HIV Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1.
- [Simon et al., 2000] Simon, H.-U., Haj-Yehia, A. and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418.

- [Simon et al., 1998] Simon, J. H., Gaddis, N. C., Fouchier, R. A. and Malim, M. H. (1998). Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4, 1397–1400.
- [Singh et al., 2015] Singh, P. K., Plumb, M. R., Ferris, A. L., Iben, J. R., Wu, X., Fadel, H. J., Luke, B. T., Esnault, C., Poeschla, E. M., Hughes, S. H., Kvaratskhelia, M. and Levin, H. L. (2015). LEDGF/p75 interacts with mRNA splicing factors and targets HIV-1 integration to highly spliced genes. *Genes & Development* 29, 2287–2297.
- [Skasko et al., 2012] Skasko, M., Wang, Y., Tian, Y., Tokarev, A., Munguia, J., Ruiz, A., Stephens, E. B., Opella, S. J. and Guatelli, J. (2012). HIV-1 Vpu Protein Antagonizes Innate Restriction Factor BST-2 via Lipid-embedded Helix-Helix Interactions. *Journal of Biological Chemistry* 287, 58–67.
- [Smed-Sørensen et al., 2005] Smed-Sørensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M. K., Andersson, J., Mascola, J. R., Spetz, A.-L. and Koup, R. A. (2005). Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Virology* 79, 8861–8869.
- [Sonza et al., 1996] Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J. and Crowe, S. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *Journal of Virology* 70, 3863–9.
- [Soto-Rifo et al., 2012] Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., Limousin, T., de Breyne, S., Décimo, D. and Ohlmann, T. (2012). DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *The EMBO Journal* 31, 3745–3756.
- [Sowd et al., 2016] Sowd, G. A., Serrao, E., Wang, H., Wang, W., Fadel, H. J., Poeschla, E. M. and Engelman, A. N. (2016). A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E1054–E1063.
- [Staple and Butcher, 2005] Staple, D. W. and Butcher, S. E. (2005). Solution Structure and Thermodynamic Investigation of the HIV-1 Frameshift Inducing Element. *Journal of Molecular Biology* 349, 1011 – 1023.
- [Stark and Jr., 2012] Stark, G. and Jr., J. D. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* 36, 503 – 514.
- [Stavrou et al., 2014] Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E. P., Kohli, R. M. and Ross, S. R. (2014). Different Modes of Retrovirus Restriction by Human APOBEC3A and APOBEC3G In Vivo. *PLOS Pathogens* 10, 1–14.

- [Stein et al., 1987] Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. and Engleman, E. G. (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* *49*, 659–668.
- [Stenglein et al., 2010] Stenglein, M. D., Burns, M. B., Li, M., Lengyel, J. and Harris, R. S. (2010). APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* *17*, 222–229.
- [Stenglein and Harris, 2006] Stenglein, M. D. and Harris, R. S. (2006). APOBEC3B and APOBEC3F Inhibit L1 Retrotransposition by a DNA Deamination-independent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 16837–16841.
- [Stevenson et al., 1990] Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P. and Lamonica, C. A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *The EMBO Journal* *9*, 1551–1560.
- [Stopak et al., 2007] Stopak, K. S., Chiu, Y.-L., Kropp, J., Grant, R. M. and Greene, W. C. (2007). Distinct Patterns of Cytokine Regulation of APOBEC3G Expression and Activity in Primary Lymphocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 3539–3546.
- [Strebel, 2013] Strebel, K. (2013). {HIV} accessory proteins versus host restriction factors. *Current Opinion in Virology* *3*, 692 – 699.
- [Stremlau et al., 2004] Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* *427*, 848–853.
- [Stremlau et al., 2006] Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D. J., Sundquist, W. I. and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 5514–5519.
- [Stremlau et al., 2005] Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S. and Sodroski, J. (2005). Species-Specific Variation in the B30.2(SPRY) Domain of TRIM5 α Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction. *Journal of Virology* *79*, 3139–3145.
- [Suarez et al., 1993] Suarez, D. L., VanDerMaaten, M. J., Wood, C. and Whetstone, C. A. (1993). Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *Journal of Virology* *67*, 5051–5055.
- [Suh et al., 1999] Suh, Y.-A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. and Lambeth, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* *401*, 79–82.

- [Sundquist and Krausslich, 2012] Sundquist, W. I. and Krausslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2.
- [Suspène et al., 2011a] Suspène, R., Aynaud, M.-M., Guétard, D., Henry, M., Eckhoff, G., Marchio, A., Pineau, P., Dejean, A., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S. (2011a). Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4858–4863.
- [Suspène et al., 2011b] Suspène, R., Aynaud, M.-M., Koch, S., Padeloup, D., Labetoulle, M., Gaertner, B., Vartanian, J.-P., Meyerhans, A. and Wain-Hobson, S. (2011b). Genetic Editing of Herpes Simplex Virus 1 and Epstein-Barr Herpesvirus Genomes by Human APOBEC3 Cytidine Deaminases in Culture and In Vivo. *Journal of Virology* 85, 7594–7602.
- [Suspène et al., 2005] Suspène, R., Guétard, D., Henry, M., Sommer, P., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J.-P. (2005). Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8321–8326.
- [Suspène et al., 2017] Suspène, R., Mussil, B., Laude, H., Caval, V., Berry, N., Bouzidi, M. S., Thiers, V., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J.-P. (2017). Self-cytoplasmic DNA upregulates the mutator enzyme APOBEC3A leading to chromosomal DNA damage. *Nucleic Acids Research* 45, 3231.
- [Suspène et al., 2006] Suspène, R., Rusniok, C., Vartanian, J.-P. and Wain-Hobson, S. (2006). Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Research* 34, 4677.
- [Swanton et al., 2015] Swanton, C., McGranahan, N., Starrett, G. J. and Harris, R. S. (2015). APOBEC Enzymes : Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discovery* 5, 704–712.
- [Tahara et al., 2013] Tahara, M., Inoue, T., Miyakura, Y., Horie, H., Yasuda, Y., Fujii, H., Kotake, K. and Sugano, K. (2013). Cell diameter measurements obtained with a handheld cell counter could be used as a surrogate marker of G2/M arrest and apoptosis in colon cancer cell lines exposed to SN-38. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434, 753 – 759.
- [Takaoka and Yanai, 2006] Takaoka, A. and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology* 8, 907–922.
- [Tanaka et al., 2006] Tanaka, T., Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (2006). Constitutive Histone H2AX Phosphorylation and ATM Activation, the Reporters of DNA Damage by Endogenous Oxidants. *Cell Cycle* 5, 1940–1945.
- [Tartour et al., 2014] Tartour, K., Appourchaux, R., Gaillard, J., Nguyen, X.-N., Durand, S., Turpin, J., Beaumont, E., Roch, E., Berger, G., Mahieux, R., Brand, D., Roingeard, P. and Cimarelli, A.

- (2014). IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* *11*.
- [Tartour and Cimarelli, 2015] Tartour, K. and Cimarelli, A. (2015). Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *Med Sci (Paris)* *31*, 377–382.
- [Tedbury and Freed, 2014] Tedbury, P. R. and Freed, E. O. (2014). The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Trends in Microbiology* *22*, 372 – 378.
- [Teng et al., 1993] Teng, B., Burant, C. and Davidson, N. (1993). Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* *260*, 1816–1819.
- [Teramoto et al., 1999] Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T. and Ouchi, Y. (1999). Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis and Necrosis in Human Lung Fibroblasts : Protective Roles of Glutathione. *The Japanese Journal of Pharmacology* *79*, 33–40.
- [Thielen et al., 2010] Thielen, B. K., McNevin, J. P., McElrath, M. J., Hunt, B. V. S., Klein, K. C. and Lingappa, J. R. (2010). Innate Immune Signaling Induces High Levels of TC-specific Deaminase Activity in Primary Monocyte-derived Cells through Expression of APOBEC3A Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 27753–27766.
- [Thierry et al., 2017] Thierry, E., Deprez, E. and Delelis, O. (2017). Different Pathways Leading to Integrase Inhibitors Resistance. *Frontiers in Microbiology* *7*, 2165.
- [Tong and Revill, 2016] Tong, S. and Revill, P. (2016). Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of Hepatology* *64*, S4 – S16.
- [Towers and Noursadeghi, 2014] Towers, G. and Noursadeghi, M. (2014). Interactions between HIV-1 and the Cell-Autonomous Innate Immune System. *Cell Host and Microbe* *16*, 10 – 18.
- [Triques and Stevenson, 2004] Triques, K. and Stevenson, M. (2004). Characterization of Restrictions to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Monocytes. *Journal of Virology* *78*, 5523–5527.
- [Trono, 1992] Trono, D. (1992). Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *Journal of Virology* *66*, 4893–4900.
- [Uchil et al., 2008] Uchil, P. D., Quinlan, B. D., Chan, W.-T., Luna, J. M. and Mothes, W. (2008). TRIM E3 Ligases Interfere with Early and Late Stages of the Retroviral Life Cycle. *PLOS Pathogens* *4*, 1–13.
- [Usami et al., 2009] Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W. and Göttlinger, H. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society Transactions* *37*, 181–184.
- [Usami et al., 2015] Usami, Y., Wu, Y. and Göttlinger, H. G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* *526*, 218–223.

- [van Boxel-Dezaire et al., 2006] van Boxel-Dezaire, A. H., Rani, M. S. and Stark, G. R. (2006). Complex Modulation of Cell Type-Specific Signaling in Response to Type I Interferons. *Immunity* *25*, 361–372.
- [Van Damme et al., 2008] Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B. and Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host & Microbe* *3*, 245–252.
- [Van Heuverswyn et al., 2006] Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H. and Peeters, M. (2006). Human immunodeficiency viruses : SIV infection in wild gorillas. *Nature* *444*, 164–164.
- [Vartanian et al., 2008] Vartanian, J.-P., Guétard, D., Henry, M. and Wain-Hobson, S. (2008). Evidence for Editing of Human Papillomavirus DNA by APOBEC3 in Benign and Precancerous Lesions. *Science* *320*, 230–233.
- [Vartanian et al., 2010] Vartanian, J.-P., Henry, M., Marchio, A., Suspène, R., Aynaud, M.-M., Guétard, D., Cervantes-Gonzalez, M., Battiston, C., Mazzaferro, V., Pineau, P., Dejean, A. and Wain-Hobson, S. (2010). Massive APOBEC3 Editing of Hepatitis B Viral DNA in Cirrhosis. *PLOS Pathogens* *6*, 1–9.
- [Vázquez et al., 2011] Vázquez, N., Schmeisser, H., Dolan, M. A., Bekisz, J., Zoon, K. C. and Wahl, S. M. (2011). Structural variants of IFN- α preferentially promote antiviral functions. *Blood* *118*, 2567–2577.
- [Ventoso et al., 2001] Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. and Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 12966–12971.
- [Vieira et al., 2014] Vieira, V. C., Leonard, B., White, E. A., Starrett, G. J., Temiz, N. A., Lorenz, L. D., Lee, D., Soares, M. A., Lambert, P. F., Howley, P. M. et al. (2014). Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *MBio* *5*, e02234–14.
- [Villinger et al., 1996] Villinger, F., Folks, T. M., Lauro, S., Powell, J. D., Sundstrom, J. B., Mayne, A. and Ansari, A. A. (1996). Immunological and virological studies of natural {SIV} infection of disease-resistant nonhuman primates. *Immunology Letters* *51*, 59 – 68.
- [Vink et al., 1990] Vink, C., Groenink, M., Elgersma, Y., Fouchier, R. A., Tersmette, M. and Plasterk, R. H. (1990). Analysis of the junctions between human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA and human DNA. *Journal of Virology* *64*, 5626–5627.

- [Wang et al., 2011] Wang, X., Abudu, A., Son, S., Dang, Y., Venta, P. J. and Zheng, Y.-H. (2011). Analysis of Human APOBEC3H Haplotypes and Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Journal of Virology* 85, 3142–3152.
- [Wang et al., 2016] Wang, Y., Wang, Z., Pramanik, A., Santiago, M. L., Qiu, J. and Stephens, E. B. (2016). A chimeric human {APOBEC3A} protein with a three amino acid insertion confers differential HIV-1 and adeno-associated virus restriction. *Virology* 498, 149 – 163.
- [Wang et al., 2014] Wang, Z., Wakae, K., Kitamura, K., Aoyama, S., Liu, G., Koura, M., Monjurul, A. M., Kukimoto, I. and Muramatsu, M. (2014). APOBEC3 Deaminases Induce Hypermutation in Human Papillomavirus 16 DNA upon Beta Interferon Stimulation. *Journal of Virology* 88, 1308–1317.
- [Warren et al., 2015] Warren, C. J., Xu, T., Guo, K., Griffin, L. M., Westrich, J. A., Lee, D., Lambert, P. F., Santiago, M. L. and Pyeon, D. (2015). APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus. *Journal of Virology* 89, 688–702.
- [Waters et al., 2009] Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wilttrout, M. E., D’Souza, S., Woodruff, R. V. and Walker, G. C. (2009). Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 134–154.
- [Wedekind et al., 2006] Wedekind, J. E., Gillilan, R., Janda, A., Krucinska, J., Salter, J. D., Bennett, R. P., Raina, J. and Smith, H. C. (2006). Nanostructures of APOBEC3G Support a Hierarchical Assembly Model of High Molecular Mass Ribonucleoprotein Particles from Dimeric Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 281, 38122–38126.
- [Wei et al., 1998] Wei, P., Garber, M. E., Fang, S.-M., Fischer, W. H. and Jones, K. A. (1998). A Novel CDK9-Associated C-Type Cyclin Interacts Directly with HIV-1 Tat and Mediates Its High-Affinity, Loop-Specific Binding to {TAR} {RNA}. *Cell* 92, 451 – 462.
- [Wei et al., 2003] Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. and Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312.
- [Weiss, 2006] Weiss, R. A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3, 67–67.
- [Weller and Coen, 2012] Weller, S. K. and Coen, D. M. (2012). Herpes Simplex Viruses : Mechanisms of DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4.
- [Weston et al., 2014] Weston, S., Czieso, S., White, I. J., Smith, S. E., Kellam, P. and Marsh, M. (2014). A Membrane Topology Model for Human Interferon Inducible Transmembrane Protein 1. *PLOS ONE* 9, 1–14.

- [Wheelock and Sibley, 1965] Wheelock, E. F. and Sibley, W. A. (1965). Circulating Virus, Interferon and Antibody after Vaccination with the 17-D Strain of Yellow-Fever Virus. *New England Journal of Medicine* 273, 194–198.
- [Willems and Gillet, 2015] Willems, L. and Gillet, N. A. (2015). APOBEC3 Interference during Replication of Viral Genomes. *Viruses* 7, 2999–3018.
- [Wlodawer and Erickson, 1993] Wlodawer, A. and Erickson, J. (1993). Structure-Based Inhibitors of HIV-1 Protease. *Annual Review of Biochemistry* 62, 543–585.
- [Woodward et al., 2009] Woodward, C. L., Prakobwanakit, S., Mosessian, S. and Chow, S. A. (2009). Integrase Interacts with Nucleoporin NUP153 To Mediate the Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 83, 6522–6533.
- [Woolaway et al., 2007] Woolaway, K., Asai, K., Emili, A. and Cochrane, A. (2007). hnRNP E1 and E2 have distinct roles in modulating HIV-1 gene expression. *Retrovirology* 4, 28.
- [Xuan et al., 2013] Xuan, D., Li, G., Cai, Q., Deming-Halverson, S., Shrubsole, M. J., Shu, X.-O., Kelley, M. C., Zheng, W. and Long, J. (2013). APOBEC3 deletion polymorphism is associated with breast cancer risk among women of European ancestry. *Carcinogenesis* 34, 2240.
- [Yamanaka et al., 1995] Yamanaka, S., Balestra, M. E., Ferrell, L. D., Fan, J., Arnold, K. S., Taylor, S., Taylor, J. M. and Innerarity, T. L. (1995). Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8483–8487.
- [Yamashita and Emerman, 2004] Yamashita, M. and Emerman, M. (2004). Capsid Is a Dominant Determinant of Retrovirus Infectivity in Nondividing Cells. *Journal of Virology* 78, 5670–5678.
- [Yamashita et al., 2007] Yamashita, M., Perez, O., Hope, T. J. and Emerman, M. (2007). Evidence for Direct Involvement of the Capsid Protein in HIV Infection of Nondividing Cells. *PLOS Pathogens* 3, 1–9.
- [Yan et al., 2013] Yan, J., Kaur, S., DeLucia, M., Hao, C., Mehrens, J., Wang, C., Golczak, M., Palczewski, K., Gronenborn, A. M., Ahn, J. and Skowronski, J. (2013). Tetramerization of SAMHD1 Is Required for Biological Activity and Inhibition of HIV Infection. *Journal of Biological Chemistry* 288, 10406–10417.
- [Yan et al., 2010] Yan, N., Regalado-Magdos, A. D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M. A. and Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol* 11, 1005–1013.
- [Yang et al., 2007] Yang, B., Chen, K., Zhang, C., Huang, S. and Zhang, H. (2007). Virion-associated Uracil DNA Glycosylase-2 and Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Are Involved in the Degradation of APOBEC3G-edited Nascent HIV-1 DNA. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11667–11675.

- [Yoshimura et al., 2007] Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7, 454–465.
- [Yount et al., 2012] Yount, J. S., Karssemeijer, R. A. and Hang, H. C. (2012). S-Palmitoylation and Ubiquitination Differentially Regulate Interferon-induced Transmembrane Protein 3 (IFITM3)-mediated Resistance to Influenza Virus. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19631–19641.
- [Yount et al., 2010] Yount, J. S., Moltedo, B., Yang, Y.-Y., Charron, G., Moran, T. M., López, C. B. and Hang, H. C. (2010). Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat Chem Biol* 6, 610–614.
- [Yu et al., 2003] Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. and Yu, X.-F. (2003). Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science* 302, 1056–1060.
- [Zack et al., 1990] Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. and Chen, I. S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes : Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61, 213 – 222.
- [Zhang et al., 2009] Zhang, F., Wilson, S. J., Landford, W. C., Virgen, B., Gregory, D., Johnson, M. C., Munch, J., Kirchhoff, F., Bieniasz, P. D. and Hatzioannou, T. (2009). Nef Proteins from Simian Immunodeficiency Viruses Are Tetherin Antagonists. *Cell Host & Microbe* 6, 54 – 67.
- [Zhang et al., 2003] Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C. and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94–98.
- [Zhang et al., 1999] Zhang, L., Ramratnam, B., Tenner-Racz, K., He, Y., Vesanen, M., Lewin, S., Talal, A., Racz, P., Perelson, A. S., Korber, B. T., Markowitz, M., Guo, Y., Duran, M., Hurley, A., Tsay, J., Huang, Y.-C., Wang, C.-C. and Ho, D. D. (1999). Quantifying Residual HIV-1 Replication in Patients Receiving Combination Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine* 340, 1605–1613.
- [Zhang et al., 2013] Zhang, T., Cai, J., Chang, J., Yu, D., Wu, C., Yan, T., Zhai, K., Bi, X., Zhao, H., Xu, J., Tan, W., Qu, C. and Lin, D. (2013). Evidence of associations of APOBEC3B gene deletion with susceptibility to persistent HBV infection and hepatocellular carcinoma. *Human Molecular Genetics* 22, 1262.
- [Zhang et al., 2016] Zhang, Z., Gu, Q., Jaguva Vasudevan, A. A., Jeyaraj, M., Schmidt, S., Zielonka, J., Perković, M., Heckel, J.-O., Cichutek, K., Haussinger, D., Smits, S. H. J. and Mank, C. (2016). Vif Proteins from Diverse Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Lineages Have Distinct Binding Sites in A3C. *Journal of Virology* 90, 10193–10208.

- [Zhang et al., 1999] Zhang, Z.-Q., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., Reinhart, T. A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C. J., Veazey, R. S., Notermans, D., Little, S., Danner, S. A., Richman, D. D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H. L., Schacker, T. W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N. L., Wolinsky, S. and Haase, A. T. (1999). Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4⁺ T Cells. *Science* 286, 1353–1357.
- [Zhu et al., 2013] Zhu, C., Gao, W., Zhao, K., Qin, X., Zhang, Y., Peng, X., Zhang, L., Dong, Y., Zhang, W., Li, P., Wei, W., Gong, Y. and Yu, X.-F. (2013). Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature Communications* 4, 2722.
- [Zhu et al., 2006] Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J. D., Grisé, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A. and Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441, 847–852.