



HAL
open science

Rôle de la sumoylation dans les activités de SAMHD1, un facteur de restriction du VIH-1 dans les cellules non cyclantes

Charlotte Martinat

► **To cite this version:**

Charlotte Martinat. Rôle de la sumoylation dans les activités de SAMHD1, un facteur de restriction du VIH-1 dans les cellules non cyclantes. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC246 . tel-02888769

HAL Id: tel-02888769

<https://theses.hal.science/tel-02888769v1>

Submitted on 3 Jul 2020

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.

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Denis Diderot

Ecole doctorale 561 Hématologie - Oncogénèse - Biothérapies

Laboratoire de Pathologie et de Virologie Moléculaire

INSERM U944 - CNRS/P7 UMR7212

Equipe de Dynamique des Rétrovirus et des Rétrotransposons

Rôle de la SUMOylation dans les activités de SAMHD1, un facteur de restriction du VIH-1 dans les cellules non-cyclantes

Par Charlotte Martinat

Thèse de doctorat de Virologie

Co-dirigée par Alessia ZAMBORLINI et Ali SAÏB

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 19 Septembre 2018

Président du jury :	Pierre-Emmanuel CECCALDI	Professeur, Université Denis Diderot, Paris
Rapporteurs :	Lucile ESPERT	CR CNRS, Institut de Recherche en Infectiologie, Montpellier
	Guillaume BOSSIS	CR CNRS, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier
Examineurs :	Florence MARGOTTIN-GOGUET	DR2 INSERM, Institut Cochin, Paris
	Asier SÁEZ-CIRIÓN	DR, Institut Pasteur, Paris
Directeur de thèse :	Alessia ZAMBORLINI	Maître de conférences, CNAM, Paris
Co-directeur :	Ali SAÏB	Professeur, Université Denis Diderot, Paris



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire mon manuscrit et d'évaluer mon travail de recherche : le Président Pierre-Emmanuel Ceccaldi, les rapporteurs Lucile Espert et Guillaume Bossis et les examinateurs Florence Margottin-Goguet et Asier Sáez-Cirión. Je suis extrêmement touchée par l'intérêt que vous avez porté à mes travaux. Les échanges scientifiques que nous avons eu durant ma thèse m'ont été indispensables et m'ont permis d'avancer dans ce projet plus sereinement.

Je remercie ensuite ma directrice de thèse Alessia Zamborlini. Alessia, j'admire ton intelligence et ta vivacité d'esprit. J'admire aussi ta force, pourtant mise à rude épreuve ces dernières années. Ton encadrement m'a permis de m'épanouir, tant sur le plan professionnel que personnel. Ces 4 années de thèse nous ont aussi permis de tisser des liens d'amitié qui me sont chers. Nous avons toutes les deux traversé des moments difficiles mais nous nous sommes toujours soutenues. Je te souhaite de trouver l'apaisement que tu mérites.

Merci à Pascale, toujours présente pour m'écouter, me donner des conseils et me soutenir. Ton encadrement et tes connaissances scientifiques ont été indispensables pour la réussite de mon travail. Et grâce à toi j'ai rencontré deux personnes exceptionnelles (tu les reconnaitras). Ta bonne humeur me manquera !

Un immense merci à Joëlle alias « ma Maman du labo ». Tu es un vrai puits de science et tu m'as appris beaucoup de choses. Tu es avant tout une personne généreuse et tu as vraiment pris soin de moi tout le temps, surtout dans les moments difficiles. Merci pour tout, je t'embrasse très fort « ma p'tite Joëlle » !

Merci à Arthur (à prononcer avec l'accent anglais) qui s'est impliqué dans ce projet de manière exemplaire. Tu ne t'es jamais plaint, tu as toujours fait du bon travail, avec le sourire et tu as su me supporter. Merci pour ton engagement, ton sérieux et ta sincère gentillesse.

Merci aussi aux membres (et ex-membres) de mon équipe. Nous avons partagé de bons moments de rigolade et de mythiques « pétages de bide » qui m'auront valu quelques kg superflus dirons-nous... Merci Antoine, Amna, Amandine, Nakou, Anastasia et Noé. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et j'espère que vous ne vous souviendrez pas de moi seulement comme la gendarme du labo...ha ha !

Ali Saïb un grand merci à toi pour nos échanges scientifiques, tes conseils et tes encouragements. Même si nos échanges ont été rares ces dernières années, tu m'auras quand même « vu grandir » !

Merci à Hugues de Thé d'avoir soutenu toutes mes démarches durant ces 4 années. Merci à tous les membres de l'unité U944 pour vos conseils mais pas que (se croiser et s'arrêter dans les couloirs pour papoter c'est bien aussi). Merci également aux membres de la plateforme technologique.

Travailler au laboratoire m'a aussi permis de croiser la route de deux personnes magnifiques qui font maintenant partie intégrante de ma vie. Anaïs je te remercie pour ton soutien et ta force impressionnante qui ont toujours su me motiver d'avantage, merci pour nos si bons moments de rigolade lors de nos soirées pyjama. Camille, je ne sais pas comment te remercier pour ta joie de vivre, ton optimisme et ton amour sincère. Merci d'être là pour moi, tu es formidable et j'espère rester à tes côtés encore très longtemps ! J'en profite d'ailleurs pour remercier et faire un gros BIG UP à la team Game of Thrones (Pholy, Tekpouf et Mitch) !

Merci à Eloïse, mon amie et partenaire dans cette épreuve. Nos moments de partage ont été pour nous une façon de nous porter mutuellement et de nous soutenir. Nous avons ri, pleuré et nous sommes énervées pour toujours finir nos entrevues par un célèbre : « allez on va y arriver ! ». Merci à toi pour ton éternel flegme et tes bons conseils.

Merci à mes deux meilleures amies : ma Lili et mon Audrey, vous qui en avez bavé autant que moi. Partager de bons moments mais aussi des moments difficiles avec vous n'a fait que renforcer nos liens d'amitié déjà si forts, et ce malgré la distance qui nous sépare. Les filles, je sais que sans vous, tout cela n'aurait pas été possible ! Merci mes sœurs de cœur, je vous aime !

Faire un doctorat demande du courage et de la motivation et à bien des moments j'ai malheureusement manqué des deux... Grâce au soutien infaillible de ma famille j'ai pu mener ce projet à terme. Vous rendre fiers m'aura fait tenir jusqu'au bout. Je n'aurai pas assez d'une page pour vous témoigner tout mon amour. Vous êtes des parents formidables. Papa, Maman, Fanny et Benoist : MERCI !

Résumé

Depuis sa découverte il y a sept ans, les recherches intensives sur SAMHD1 en ont fait un facteur cellulaire important qui limite la réplication du Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) à l'étape de transcription inverse dans les cellules immunitaires non-cyclantes. Le VIH-2 et certains Virus de l'immunodéficience simienne (VIS) surmontent cette restriction en exprimant la protéine Vpx, qui conduit SAMHD1 à sa dégradation protéasomique. De nombreuses données expérimentales indiquent que l'activité triphosphohydrolase (dNTPase) de SAMHD1, qui diminue les niveaux cellulaires de dNTP, est responsable de la restriction. Cependant, la seule expression de SAMHD1 ne suffit pas à rendre les cellules résistantes à l'infection par le VIH-1 et ce quel que soit le type cellulaire. De plus, il n'existe pas de corrélation stricte entre la fonction neutralisante de SAMHD1 et sa capacité à dégrader les dNTP. Il a été suggéré que la phosphorylation du résidu T592 puisse inhiber les fonctions antivirales de SAMHD1 dans les cellules en division. Cependant, l'étude de mutants phospho-mimétiques ou phospho-ablatifs mène à des résultats contradictoires. Ces données permettent d'envisager que l'activité antivirale de SAMHD1 ne repose pas exclusivement sur son activité dNTPase et que sa régulation ne peut pas être expliquée que par la phosphorylation.

Nous avons démontré que SAMHD1 est modifiée par la SUMOylation, i.e. une modification post-traductionnelle consistant en la conjugaison réversible des protéines SUMO ; et avons identifié les sites principaux modifiés. Nos résultats indiquent que les mutations empêchant la SUMOylation de SAMHD1, particulièrement celle du résidu K595 adjacent au résidu phosphorylable T592, invalident sa fonction antivirale sans affecter son activité dNTPase. Un phénotype similaire est observé après suppression de la région C-terminale de SAMHD1 (résidus 595-626). Nous suggérons donc que les résidus K595 SUMOylé et T592 phosphorylé font partie d'une interface responsable du recrutement d'un co-facteur méconnu, dépendant du type cellulaire, et pouvant jouer un rôle dans le mécanisme de restriction de l'infection par le VIH-1.

Notre travail permet d'entrevoir un nouvel aspect de la régulation de SAMHD1 et contribue à la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents à son pouvoir antiviral. L'identification d'un ou plusieurs partenaires cellulaires de SAMHD1 permettra de mieux comprendre le mécanisme de restriction et pourra servir de cible thérapeutique pour combattre l'infection par le VIH-1.

Summary

Since its discovery seven years ago, SAMHD1 has emerged as an important cellular factor that limits the replication of the Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) at the reverse transcription step in non-cycling immune cells. HIV-2 and some SIV overcome this restriction by encoding the Vpx protein, which bridges SAMHD1 to the proteasomal degradation pathway. A wealth of experimental evidence indicates that SAMHD1 triphosphohydrolase (dNTPase) activity, which is responsible for cellular dNTP pools depletion, accounts for the premature termination of viral replication. Notably, SAMHD1 expression is not sufficient to render any tested cell type resistant to HIV-1. Besides, there is no strict link between SAMHD1 capacity to deplete dNTP pools and its neutralizing function. Phosphorylation of residue T592 is proposed to downregulate the antiviral function of SAMHD1 in cycling cells. However, the analysis of phosphomimetic or unphosphorylatable mutants of SAMHD1 leads to contradictory results. Altogether, these data suggest that SAMHD1-mediated restriction may neither exclusively rely on its dNTPase activity, nor solely depend on the phosphorylation status of T592.

We have demonstrated that SAMHD1 undergoes SUMOylation, i.e. a post-translational modification consisting in the reversible conjugation of SUMO on a target protein; and have identified the major sites of modification. Our results show that mutations preventing SAMHD1 SUMOylation, in particular at residue K595 that lies close to the phosphorylatable T592 site, inhibit its antiviral properties without impairing its dNTPase activity. Notably, an analogous phenotype is observed upon deletion of SAMHD1 C-terminus (Δ 595-626). Based on these data, we speculate that phosphorylatable T592 and SUMOylated K595 residues are part of an interface in SAMHD1 C-terminal tail that is responsible for the recruitment of still unknown cofactor(s) involved in the mechanism of HIV-1 infection restriction.

Our work highlights a novel aspect of SAMHD1 regulation and participates to the characterization of molecular basis underlying its antiviral function. The identification of one or several cellular partners will allow a better understanding of retroviral restriction mechanism and could serve as new therapeutic targets to fight HIV-1 infection.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
ABREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION	6
1/ LES VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 ET 2	6
1.1 <i>Présentation des rétrovirus</i>	6
1.1.1 Origines et classification des VIH-1 et VIH-2	6
1.1.2 Physiopathologie de l'infection par les VIH.....	8
1.1.3 Epidémiologie de l'infection par le VIH	10
1.1.4 Thérapie antirétrovirale et limitations	11
1.2 <i>Structure et organisation génomique des VIH-1 et VIH-2</i>	13
1.2.1 Structure du virion	13
1.2.2 Organisation du génome viral.....	14
1.3 <i>Cycle de réplication du VIH-1</i>	16
1.3.1 Attachement, fusion et entrée du virus	18
1.3.2 Décapsidation et transcription inverse	18
1.3.3 Import nucléaire et intégration du génome viral	20
1.3.4 Transcription et traduction du provirus.....	22
1.3.5 Assemblage, bourgeonnement et maturation de la particule virale	23
2/ LES FACTEURS DE RESTRICTION, GARDIENS DE LA CELLULE HÔTE CONTRE LES RÉTROVIRUS.....	24
2.1 <i>Caractéristiques et découverte des facteurs de restriction du VIH-1</i>	24
2.2 <i>Mode d'action des facteurs de restriction et relations avec leurs antagonistes viraux</i>	27
2.2.1 La protéine TRIM5 α	27
2.2.2 APOBEC3G et son antagoniste viral Vif	30
2.2.3 Tetherin/BST2, contrée par Vpu	31
2.2.4 SERINC5 et son adversaire viral Nef.....	33
2.2.5 La protéine MxB	35
3/ SAMHD1, UN FACTEUR DE RESTRICTION ACTIF DANS LES CELLULES NON-CYCLANTES	37
3.1 <i>Identification de SAMHD1 comme facteur de restriction</i>	37
3.2 <i>Expression et localisation de SAMHD1</i>	39
3.2.1 Expression à l'échelle de l'organe	39
3.2.2 Expression à l'échelle de la cellule	40
3.2.3 Expression à l'échelle intracellulaire	40
3.2.4 Trafic intracellulaire de SAMHD1.....	41
3.2.5 Effet de différentes cytokines sur l'expression de SAMHD1	41
3.3 <i>Interaction avec et dégradation par la protéine Vpx</i>	42
3.3.1 Importance de la localisation nucléaire de SAMHD1	42
3.3.2 Déterminants structuraux de SAMHD1 impliqués dans la dégradation par Vpx.....	44
3.3.3 Une spécificité inter-espèces détermine l'interaction entre les protéines SAMHD1 et Vpx.....	46
3.4 <i>Organisation structurale de SAMHD1</i>	48
3.4.1 Architecture de SAMHD1.....	48
3.4.1.1 Domaine SAM.....	48
3.4.1.2 Domaine Histidine et Aspartate.....	48
3.4.1.3 NLS et région C-terminale.....	49
3.4.2 Structure de SAMHD1	49
3.4.3 Rôle de l'oligomérisation dans les activités cellulaires et de restriction	51
3.5 <i>Activités cellulaires de SAMHD1</i>	53
3.5.1 Dégradation des dNTP	53
3.5.2 Dégradation des acides nucléiques.....	56
3.6 <i>Modification post-traductionnelles de SAMHD1</i>	57
3.6.1 La phosphorylation	58
3.6.1.1 SAMHD1 est phosphorylée principalement sur le résidu T592 par le complexe cycline/kinase CyclinA2/CDK1-CDK2.....	58
3.6.1.2 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur son oligomérisation	60
3.6.1.3 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur ses activités cellulaires.....	61
3.6.1.4 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur son activité antivirale.....	63
3.6.1.5 La phosphorylation de SAMHD1 chez la souris	64
3.6.2 Répression transcriptionnelle par la méthylation	65
3.6.3 Acétylation	66
3.7 <i>SAMHD1 et le rétro-élément LINE-1</i>	66
3.7.1 Divergences quant à la restriction de LINE-1 par SAMHD1	66
3.7.2 Les activités cellulaires et de restriction de SAMHD1 interviennent elles dans l'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 ?	67
3.7.3 L'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 par SAMHD1 est-elle régulée par la phosphorylation ?	68

3.7.4	Quelle étape de la mobilité de LINE-1 est ciblée par SAMHD1 ?	68
3.7.5	SAMHD1 séquestre LINE-1 dans les granules de stress	69
3.7.6	Conservation et inhibition d'autres rétro-éléments.....	69
3.8	<i>Implications cliniques</i>	70
3.8.1	Syndrome d'Aicardi-Goutières	70
3.8.2	Restriction du virus de l'hépatite B	71
3.8.3	Cancer et leucémie.....	72
4/	LA SUMOYLATION : UNE MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE RÉVERSIBLE	73
4.1	<i>Présentation des protéines SUMO</i>	73
4.2	<i>Motifs de liaison covalente et non covalente des protéines SUMO</i>	76
4.3	<i>Les STUbL font le lien entre SUMOylation et ubiquitination</i>	77
4.4	<i>Cycle de SUMOylation</i>	78
4.5	<i>Implication de la SUMOylation dans la réplication des Rétrovirus</i>	79
4.5.1	SUMOylation et VIH-1	80
4.5.2	SUMOylation et HTLV-1	81
4.5.3	SUMOylation et MLV	81
4.6	<i>Cas particulier de la SUMOylation du facteur de restriction du VIH-1, TRIM5α</i>	82
5/	PROBLÉMATIQUE	83
PREMIERE PARTIE : CARACTERISATION DU ROLE DE LA SUMOYLATION DANS LES ACTIVITES DE SAMHD1, UN FACTEUR DE RESTRICTION DU VIH-1.....		84
1/	OBJET DE L'ÉTUDE	84
2/	ARTICLE	85
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA SUMOYLATION DU RESIDU K595 DE SAMHD1.....		110
1/	INTRODUCTION	110
2/	L'INHIBITION DE LA SUMOYLATION DE SAMHD1 SUR LE RÉSIDU K595 EST RESPONSABLE DE LA PERTE DE L'ACTIVITÉ ANTI-VIH-1	110
3/	L'INHIBITION DE LA SUMOYLATION DE SAMHD1 SUR LE RÉSIDU K595 N'INFLUENCE PAS L'ACTIVITÉ DNTPASE	113
4/	INTER-RELATION ENTRE LA PHOSPHORYLATION ET LA SUMOYLATION DE SAMHD1	114
5/	CONCLUSION	116
TROISIEME PARTIE : RESULTATS PRELIMINAIRES SUR L'ETUDE DE LA SUMOYLATION NON-COVALENTE DE SAMHD1 ET LA RECHERCHE DE PARTENAIRES CELLULAIRES DU FACTEUR DE RESTRICTION.		118
1/	INTRODUCTION	118
2/	SAMHD1 CONTIENT DEUX SITES SIM DONT UN LUI PERMET D'INTERAGIR AVEC SUMO.....	118
3/	ANALYSES PROTÉOMIQUE ET TRANSCRIPTIONNELLE VISANT À IDENTIFIER LES CO-FACTEURS DE SAMHD1 (RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES)	123
4/	CONCLUSION	125
DISCUSSION		127
1/	MISE EN ÉVIDENCE D'UNE NOUVELLE VOIE DE RÉGULATION DE SAMHD1.....	127
2/	QU'ADVIENT-IL DE SAMHD1 APRÈS SA SUMOYLATION ?	128
3/	QUELLE IMPLICATION POUR LES RÉSIDUS K469 ET K622 ?	129
4/	LE K595 : UN RÉSIDU LYSINE QUI CACHE BIEN SON JEU.....	130
5/	LA PROTÉINE MYSTÈRE : IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU CO-FACTEUR DE SAMHD1	130
6/	HYPOTHÈSES SUR L'IMPACT DE LA SUMOYLATION DE SAMHD1 SUR LA RÉPARATION DES CASSURES ADN	131
7/	MODÈLE QUI ASSOCIE MES TRAVAUX AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	131
8/	COMMENT MANIPULER SAMHD1 À DES FINS THÉRAPEUTIQUES ?.....	133
BIBLIOGRAPHIE		134

Table des illustrations

Figure 1. Origines des VIH.....	8
Figure 2. Progression de l'infection par le VIH.....	10
Figure 3. Structure et composition de la particule virale du VIH-1.	14
Figure 4. Représentation schématique du génome des VIH-1 et VIH-2.	16
Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1 et sites d'action de six classes de molécules antirétrovirales.	17
Figure 6. Etape de transcription inverse.....	20
Figure 7. Principe de la fusion cellulaire ou hétérocaryon.	26
Figure 8. Action des principaux facteurs de restriction sur les étapes du cycle de réplication du VIH.....	27
Figure 9. Structure de TRIM5α.....	28
Figure 10. Mode d'action d'APOBEC3G et de son antagoniste viral Vif.	31
Figure 11. Rétention du VIH à la membrane par Tetherin/BST2.	33
Figure 12. SERINC5 empêche la libération cytoplasmique du corps viral.	35
Figure 13. Modèle de restriction par SAMHD1 proposé en 2011.....	39
Figure 14. Interface d'interaction SAMHD1/Vpx/DCAF1.....	45
Figure 15. Reconnaissance spécifique de SAMHD1 par Vpx selon l'espèce.....	47
Figure 16. Schéma représentant les domaines de SAMHD1.	48
Figure 17. Architecture du tétramère de SAMHD1.	50
Figure 18. Mécanisme d'oligomérisation et d'activation de SAMHD1.....	53
Figure 19. Modèle de la régulation de SAMHD1 par la phosphorylation sur le résidu T592.	59
Figure 20. Modèle de restriction par SAMHD1 proposé en 2015.....	64
Figure 21. Comparaison des protéines SUMO et de l'Ubiquitine.....	75
Figure 22. Le cycle de SUMOylation.	79
Figure 23. L'inhibition de la SUMOylation de SAMHD1 rend les cellules permissives à l'infection par le VIH-1.....	112
Figure 24. Les mutants de perte de SUMOylation qui ne peuvent plus contrer le virus maintiennent une activité dNTPase fonctionnelle.	114
Figure 25. Interrelation entre la SUMOylation et la phosphorylation de SAMHD1.	115
Figure 26. SAMHD1 contient deux sites SIM potentiellement fonctionnels.....	119
Figure 27. Les mutants de perte de SUMOylation de SAMHD1 interagissent toujours avec SUMO.	120
Figure 28. Effet de la mutation du SIM sur la SUMOylation de SAMHD1.	122
Figure 29. Analyses comparatives de données RNAseq de cellules cyclantes et non-cyclantes.	125
Figure 30. Modèle de restriction de SAMHD1 en fonction de l'état de division de la cellule.....	132

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	ISG : interferon-stimulated gene
ADNc : ADN complémentaire	LAV : lymphadenopathy-associated virus
ADNv : ADN viral	LEDGF : lens epithelium-derived growth factor
AGS : syndrome d'Aicardi-Goutières	LINE-1 : long interspersed nuclear element 1
APL : acute promyelocytic leukemia	LLC : leucémie lymphoïde chronique
APOBEC : apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like	LTR : long terminal repeat
ARN : acide ribonucléique	MA : matrice
ARNm : ARN messenger	MDDC : monocyte-derived dendritic cells
ARNt : ARN de transfert	MDM : monocyte-derived macrophage
ARNv : ARN viral	MLV : murine leukemia virus
AZT : azydothymidine ou zidovudine	Mx2(B) : myxovirus resistance protein 2(B)
CA : capsid	NC : nucléocapside
CCR5 : C-C chemokine receptor type 5	Nef : negative regulatory factor
CD4 : cluster of differentiation 4	NFκB : nuclear factor-kappa B
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4	NLS : nuclear localization signal
CypA : Cyclophiline A	NRTI : nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor
DCIP : dendritic cell-derived IFN-γ induced protein	NNRTI : non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor
dNTP : deoxynucleotide triphosphate	PAMP : pathogen-associated molecular pattern
dNTPase : deoxynucleotide triphosphate triphosphohydrolase	PBMC : peripheral blood mononuclear cell
Env : envelope	PBS : primer binding site
ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport	PI : protease inhibitor
Fv1 : friend susceptibility 1	PIAS : protein inhibitor of activated STAT
Gag : group-specific antigen	PIC : pre-integration complex
GFP : green fluorescent protein	PML : promyelocytic leukemia protein
HAART : highly active antiretroviral therapy	Ppt : polypurine tract
HBV : virus de l'hépatite B	PR : protéase
IFN : interféron	PRR : pathogen recognition receptor
IN : intégrase	Pr55 ^{Gag} : précurseur Gag de 55kDa
INI : intergase inhibitor	PrEP : pre-exposure prophylaxis

Pro-pol : Protease and polymerase
RanBP2 : Ran binding protein 2
RanGAP1 : Ran GTPase-activating protein 1
Rev : Regulator of expression of viral proteins
RNaseH : ribonuclease H
RNF4 : RING finger protein 4
RNF111 : RING finger protein 111
RNR : ribonucleotide reductase
RT : reverse transcriptase
RTC : reverse transcription complex
SAMHD1 : sterile alpha motif and HD containing protein 1
MLV : sentrin-specific protease 1
SERINC : serine incorporator
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SIM : SUMO-interacting motif
SLX4 : structure-specific endonuclease subunit
SP1, SP2 : spacer peptide 1, -2
STUbL : SUMO-targeted ubiquitin ligase
SU/gp120 : surface glycoprotein 120
SUMO : small ubiquitin-like modifier
TAR : trans-activation response element
Tat : transactivator of transcription
Tetherin/BST2 : Tetherin/bone marrow stromal antigen 2
TM/gp41 : transmembrane glycoprotein 41
TREX1 : three-prime repair exonuclease 1
TRIM5 : tripartite motif-containing protein 5
Ub : ubiquitine
Ubc9 : ubiquitin-like conjugating enzyme
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
Vif : viral infectivity factor
VIS : virus de l'immunodéficience simienne
Vpr : viral protein R
Vpu : viral protein U
Vpx : viral protein X
ZNF451 : zinc finger protein 451

INTRODUCTION

Introduction

1/ Les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2

1.1 Présentation des rétrovirus

1.1.1 Origines et classification des VIH-1 et VIH-2

La première description du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquis ou SIDA est faite en 1981 lorsque le Centre de contrôle des maladies (CDC) d'Atlanta relève en Californie cinq cas de pneumonie chez des homosexuels, une affection pulmonaire rare frappant habituellement des patients immuno-déprimés (Gottlieb et al., 1981). En 1982, cette maladie est appelée SIDA et son étude révèle qu'elle se transmet par voie sexuelle mais aussi par voie sanguine, par le lait maternel et par les sécrétions vaginales. De nombreux cas sont rapportés dans les populations d'homosexuels, de toxicomanes et d'hémophiles. En 1983, les chercheurs français de l'Institut Pasteur Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi et Jean-Claude Chermann isolent le virus responsable du SIDA à partir d'un ganglion lymphatique d'un patient atteint de lymphadénopathie et l'appellent LAV pour « Lymphadenopathy-associated virus » (Barre-Sinoussi et al., 1983). Un an plus tard, le Professeur Gallo aux Etats-Unis annonce avoir isolé le même virus. En 1986, l'agent étiologique du SIDA est officiellement renommé VIH pour Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Les VIH font partie de la famille des Rétrovirus. Leurs caractéristiques essentielles telles que leur longue période d'incubation et leur effet cytopathogène les classent dans le genre *Lentivirus*, constitué de cinq séro-groupes en fonction de l'espèce animale infectée : les bovins (VIB), les équidés (VAIE), les félins (VIF), les caprins (AEC et VMV) et les primates (VIH et VIS). A ce jour, deux types de virus VIH ont été décrits : le VIH-1, ayant une distribution à l'échelle planétaire, et le VIH-2 circulant essentiellement en Afrique de l'Ouest (Hemelaar, 2012). Les VIH proviennent de multiples transmissions zoonotiques de VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne) de primates à l'Homme dans l'Ouest et le Centre de l'Afrique (Figure 1). Il est fortement suggéré que ce franchissement de la barrière d'espèce a eu lieu lorsque des Hommes ont subi des morsures et/ou griffures de primates au cours de la chasse, une activité qui alimente la vente de viande de brousse, le trafic d'animaux ou leur utilisation comme animaux de compagnie (Hemelaar, 2012).

Le **VIH de type 1**, à l'origine de la pandémie, est divisé en quatre groupes : M (« major group »), O (« outlier group ») et N (« non-M, non-O group) identifiés depuis les années 80, qui proviendraient chacun d'une transmission indépendante du VIS infectant le chimpanzé (VIS_{cpz}) à l'Homme (Figure 1). Le VIH-1M est prédominant et présent sur tous les continents. Il comporte 9 sous-groupes (A à K) ainsi qu'au moins 89 formes recombinantes circulantes. Les groupes O et N ont une distribution géographique restreinte à l'Afrique Centrale. Seulement un cas d'infection par

le virus du groupe P, fortement apparenté aux VIS du chimpanzé (VIS_{cpz}) et du gorille (VIS_{gor}), a été décrit à ce jour.

Le **VIH de type 2**, composé des groupes A à G, a été identifié pour la première fois en 1986 comme causant le SIDA chez des patients d'Afrique de l'Ouest. Les symptômes étaient similaires à ceux observés lors d'une infection au VIH-1 mais la sérologie était négative (Clavel et al., 1986). Contrairement au VIH-1 qui s'est propagé sur toute la surface du globe, le VIH-2 reste endémique à l'Ouest africain. Par conséquent il est beaucoup plus difficile de calculer l'incidence du VIH-2 que celle du VIH-1. De plus, des données épidémiologiques indiquent que, dans des zones initialement touchées par le VIH-2, le nombre de cas d'infection déclinent pour laisser place à une augmentation de la prévalence du VIH-1 (Hamel et al., 2007).

La propagation pandémique du VIH-1, contrairement à celle du VIH-2, provient sûrement de différences dans les taux de transmissions des virus (Kanki et al., 1994). Des études visant à évaluer les facteurs de risques dans la détection des deux virus dans le tractus génital indiquent que la charge virale est beaucoup plus basse dans le plasma des personnes infectées par le VIH-2 (Popper et al., 1999), reflétant une différence de pathogénicité entre les deux virus. De nombreuses différences entre les deux virus touchent aussi les manifestations cliniques: le sarcome de Kaposi est beaucoup plus fréquent chez les personnes atteintes du VIH-1, tout comme des fièvres chroniques et des candidoses buccales. Alors que chez les personnes atteintes du VIH-2 on observe davantage des diarrhées chroniques et bactériennes, des encéphalites ou des angiocholites. Cela pourrait venir du fait que des maladies plus lentes ont le temps d'émerger dans le cas du VIH-2 pour lequel la dynamique d'apparition du SIDA est plus longue que celle du VIH-1 (Campbell-Yesufu et Gandhi, 2011; Nyamweya et al., 2013). Une autre possibilité pour expliquer que le VIH-2 est moins pathogène réside dans la différence d'interaction des deux virus avec les récepteurs et co-récepteurs des cellules cibles. Le VIH-2 pourrait avoir une moins grande affinité pour le récepteur CD4, allant même jusqu'à interagir directement avec le co-récepteur sans passer par le CD4. Bien qu'on puisse penser que cela donne un avantage au virus, ces études suggèrent que cette interaction induirait le recrutement d'anticorps neutralisant au niveau du co-récepteur favorisant une réponse immune de l'hôte (Azevedo-Pereira et Santos-Costa, 2016).

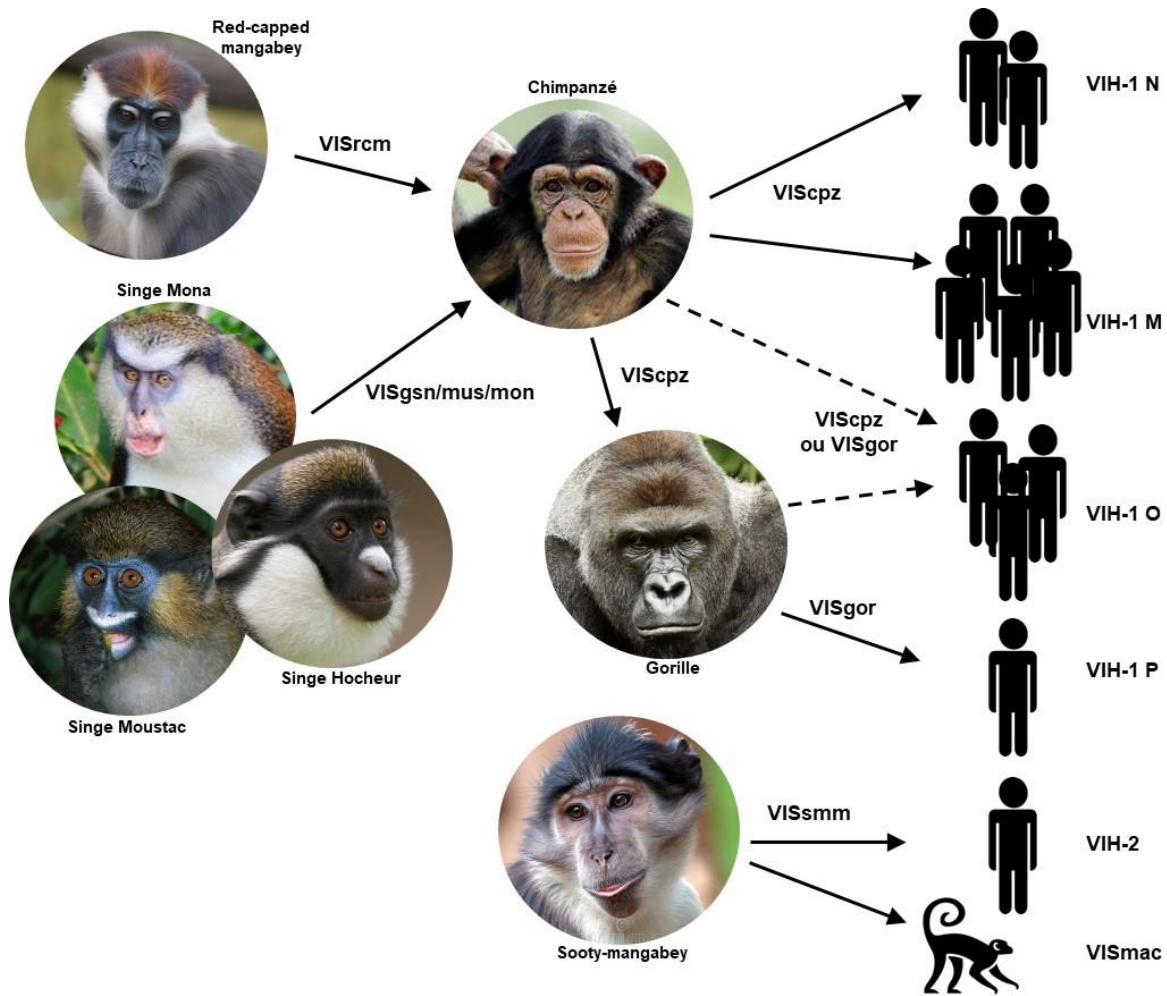


Figure 1. Origines des VIH.

Les singes de l’Ancien Monde sont naturellement infectés par plus de 40 lentivirus simiens différents : les VIS dont le suffixe détermine leur espèce d’origine (par exemple VISrcm du Red-capped mangabey). Plusieurs de ces VIS ont franchi la barrière d’espèce vers les grands singes et l’Homme, générant de nouveaux virus dont les VIH-1 et VIH-2. Adaptée de (Sharp et Hahn, 2011).

1.1.2 Physiopathologie de l’infection par les VIH

Les deux virus causent une profonde immunodéficience, mais la progression vers le stade SIDA est moins fréquente dans les infections par le VIH-2. Ceci dit, lorsque le SIDA est déclaré les manifestations cliniques et la sévérité du syndrome sont très similaires quel que soit le virus (Martinez-Steele et al., 2007; Ndour et al., 2000).

Il faut souvent plusieurs années depuis la primo-infection jusqu’au développement des symptômes de la maladie et de l’immuno-dépression sévère, et les symptômes de la maladie varient grandement au sein de la population infectée.

Le début de l’infection par le VIH, ou primo-infection, est dans la majorité des cas asymptomatique ou accompagnée de symptômes grippaux de faible intensité. Il s’ensuit rapidement

une phase aigüe au cours de laquelle, en dépit de l'absence de symptômes, le virus se réplique efficacement dans les lymphocytes T CD4+ activés conduisant à leur destruction, et à long terme un effondrement progressif du système immunitaire (Figure 2) (Moir et al., 2011). Cette phase dure environ 3 mois jusqu'à la séroconversion, lorsque les anticorps anti-VIH sont détectables dans le sang d'un individu récemment infecté.

Très tôt après l'invasion de l'organisme hôte, le VIH établit des réservoirs viraux dans lesquels le virus est à l'état de latence. L'établissement de ces réservoirs empêche l'éradication du virus et garantit sa persistance dans l'organisme. Lors de l'interruption de la thérapie antirétrovirale, ce sont les virus présents dans ces réservoirs qui se réactivent et qui sont à l'origine d'une infection encore plus forte.

Après 3 à 6 mois survient la phase asymptomatique durant laquelle la production de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et d'anticorps par le système immunitaire permet de contenir la charge virale. Cette phase peut s'étendre sur quelques mois comme sur plusieurs années. Mais le système immunitaire s'épuise inévitablement (c'est l'immuno-dépression) et le taux de cellules T CD4+ décroît progressivement au cours du temps. Le SIDA est déclaré quand le nombre de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 200 par microlitre. Le patient immuno-déprimé atteint du SIDA est beaucoup plus sensible à d'autres pathologies que l'on appelle maladies opportunistes (Lewin-Smith et al., 1998) et qui mènent en quelques années au décès du malade.

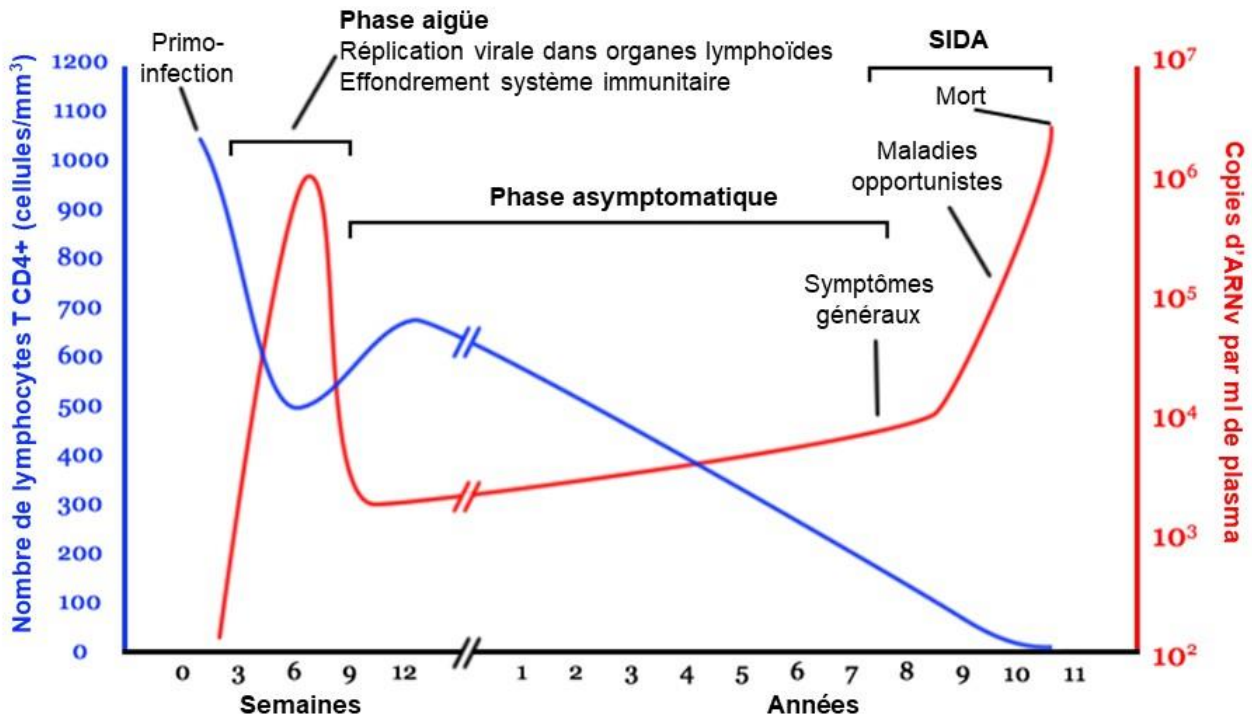


Figure 2. Progression de l'infection par le VIH.

Evolution caractéristique du nombre de lymphocytes T CD4+ (ligne bleue) et de la charge virale (ligne rouge) au cours des trois stades de l'infection : phase aiguë, phase asymptomatique et SIDA. Adaptée de (Naif, 2013).

1.1.3 Épidémiologie de l'infection par le VIH

Plus de 76 millions de personnes ont été infectées par le VIH depuis l'identification du virus dans les années 80, dont 35 millions sont mortes des suites de maladies opportunistes liées au SIDA (ONUSIDA 2017). Les données épidémiologiques relatives à l'année 2015 annoncent qu'environ 36,7 millions de personnes vivent avec le VIH à travers le monde (ONUSIDA 2017). Toutefois, les décès liés au SIDA ont diminué de 48%, on dénombre 1 million de morts en 2016 contre 2 millions en 2005, l'année la plus meurtrière.

La principale cause de décès chez les personnes infectées par le VIH est la tuberculose. En 2015, 11% des cas de tuberculose à l'échelle mondiale correspondaient à une co-infection avec le VIH. Près de 2 millions de personnes ont été infectées par le VIH en 2016. Chez l'adulte on note une baisse du nombre de nouvelles infections d'environ 11% depuis 2010, chez l'enfant cette baisse est de 47%, ce qui témoigne des avancées dans la mise en place de traitements thérapeutiques.

1.1.4 Thérapie antirétrovirale et limitations

C'est en 1985, quatre ans après le premier cas d'infection rapporté, que la France autorise la commercialisation du premier test de dépistage du SIDA. En 1986, la zidovudine (AZT ou azydothymidine), premier médicament antirétroviral, est mise sur le marché (Mitsuya et al., 1985). En 2017, 21 millions de personnes vivant avec le VIH accédaient à un traitement antirétroviral contre moins de 8 millions en 2010 (ONUSIDA 2017).

Au cours des 30 dernières années, la compréhension du cycle de réplication du VIH associée à l'intensité de la recherche thérapeutique ont permis de mettre au point des thérapies antirétrovirales hautement actives (HAART). Les HAART qui combinent 3 molécules ciblant différentes étapes du cycle de réplication du virus, réduisent l'incidence de l'infection et rallongent notablement l'espérance de vie des personnes infectées (diminuant ainsi la morbidité) (Palella et al., 1998). Bien que les HAART ne permettent pas d'éradiquer le virus, elles réduisent durablement la charge virale en dessous du seuil de détection des tests de diagnostics et ralentissent l'apparition de virus résistants. Grâce à ces thérapies, le VIH/SIDA est passé de maladie rapidement létale à condition chronique gérable.

Il existe 6 classes d'HAART qui peuvent être combinées pour augmenter l'efficacité du traitement (Figure 5) :

- les **inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (NRTI)** sont des analogues de désoxyribonucléotides naturels ne possédant pas de région 3'-hydroxyle. Leur incorporation par la transcriptase inverse dans le brin d'ADN viral naissant bloque l'étape de rétrotranscription. L'AZT fait partie de cette classe.
- les **inhibiteurs non-nucléosidiques/non-nucléotidiques de la transcriptase inverse (NNRTI)** sont des inhibiteurs allostériques qui altèrent l'activité de l'enzyme en induisant un changement conformationnel de son site catalytique.
- les **inhibiteurs d'entrée** induisent un changement conformationnel du co-récepteur cellulaire CCR5 afin que ce dernier ne soit plus reconnu par la glycoprotéine virale SU/gp120 (Dorr et al., 2005).
- les **inhibiteurs de fusion** sont des peptides analogues au domaine N-terminal de la glycoprotéine virale TM/gp41 qui empêchent cette dernière d'induire la fusion des membranes virale et cellulaire. L'Enfuvirtide T-20 est la seule molécule utilisée à l'heure actuelle (Lalezari et al., 2003).
- les **inhibiteurs de l'intégrase (INI)** bloquent son activité de transfert de brin en entrant en compétition avec l'ADN ciblé lors de l'intégration. Le Raltegravir est la première molécule de cette classe à avoir été approuvée (Nguyen et al., 2011), le Dolutegravir et l'Elvitegravir sont aussi commercialisés.

- les **inhibiteurs de la protéase (PI)** empêchent l'enzyme de cliver les poly-protéines précurseurs dans le virion néo-assemblé en se fixant au niveau de son site actif. La particule virale n'est donc pas maturée et reste non infectieuse.

De nouvelles classes d'antirétroviraux sont actuellement en cours de développement : des inhibiteurs d'entrée qui maintiennent la SU/gp120 en conformation « fermée » et l'empêchent de se lier au récepteur CD4 (Thompson et al., 2017) ; de nouveaux inhibiteurs allostériques de l'intégrase qui inhibent son interaction avec le co-facteur LEDGF/p75 par un mécanisme compétitif (Engelman et al., 2013).

Cependant, les HAART ciblent exclusivement le virus se répliquant de manière active. Ainsi les réservoirs de virus latent qui s'établissent précocement au cours de l'infection, restent un obstacle majeur à l'éradication du virus chez les personnes infectées (Pham et Mesplede, 2018). Les réservoirs viraux sont divisés en deux catégories : 1) les tissus lymphoïdes riches en cellules cibles du VIH et qui sont des compartiments anatomiques peu accessibles aux antirétroviraux, 2) les réservoirs cellulaires dans lesquels le provirus est en « dormance » mais peut se ré-activer (comme par exemple à l'arrêt d'un traitement antirétroviral) et dans ce cas, se répliquer très efficacement (Barton et al., 2016; Siliciano et al., 2003). Dans cette deuxième catégorie, le virus est latent et ne se réplique pas. Ce qui définit une cellule réservoir c'est qu'à tout moment le virus peut s'y réactiver et redevenir répliatif. La majorité des cellules réservoirs de l'organisme sont des cellules T CD4+ mémoires (les cellules mémoires centrales, les cellules mémoire effectrices...). Il existe pour l'heure un débat concernant la capacité des macrophages à persister dans le temps en tant que réservoir (Churchill et al., 2016). La compréhension de l'établissement et du maintien des réservoirs viraux représentent donc des enjeux majeurs dans le développement de traitements capables de cibler les cellules mémoires infectées de manière latente ou de réactiver le virus latent pour le rendre accessible aux HAART (van Marle et al., 2018).

Outre les réservoirs viraux, les limitations de la thérapie concernent l'émergence de virus résistants (Hue et al., 2009; Rhee et al., 2016). Malgré la combinaison de plusieurs molécules aux modes d'action différents, le VIH possède une grande faculté d'adaptation qui lui permet d'échapper aux antirétroviraux et place ainsi les patients en échec thérapeutique. La transcriptase inverse est une ADN polymérase peu fidèle qui possède un fort taux d'erreurs mais ne possède pas d'activité de relecture et participe donc à la variabilité génétique du VIH (Preston et al., 1988; Roberts et al., 1988). L'expansion mondiale de l'épidémie résulte en une grande diversité génétique du VIH (Taylor et al., 2008) qui peut aussi être due à la co-infection d'un même individu par deux sous-types différents du virus. L'élaboration de vaccins préventifs s'est révélée être un défi majeur qui n'a toujours pas été surmonté, notamment à cause de la grande variabilité de séquence de la SU/gp120.

Un autre problème majeur dans le traitement du VIH vient du fait que la prise d'HAART sur le long terme entraîne chez le patient l'apparition de toxicités (cardiovasculaires, rénales, osseuses

ou neurologiques). Cela résulte dans certains cas en l'arrêt ou la diminution de la prise du traitement et participe donc à la sélection de virus résistants et à l'échappement viral. Il est donc primordial d'améliorer les conditions de traitements en développant des molécules plus puissantes et mieux tolérées.

En parallèle, une nouvelle stratégie de prévention du VIH a été mise en place : la PrEP pour Pré Exposition Prophylaxie. La PrEP propose à une personne qui n'est pas porteuse du VIH, qui n'utilise pas systématiquement de moyen de protection (préservatif) et qui présente un fort risque d'être infectée, un médicament actif contre le virus afin de réduire voire d'empêcher le risque de le contracter. A l'heure actuelle, un seul et unique médicament (le Truvada) a une efficacité prouvée pour un usage en PrEP : utilisé depuis plus de 10 ans, il combine deux molécules inhibitrices de la transcriptase inverse du VIH. Il ne faut pas confondre la PrEP avec le traitement d'urgence dit TPE : Traitement Post-Exposition qui dure un mois et qui doit être pris dans les 48h après un risque.

1.2 Structure et organisation génomique des VIH-1 et VIH-2

1.2.1 Structure du virion

La particule virale possède une forme sphérique dont le diamètre varie de 120 à 160nm (Figure 3). L'enveloppe qui la protège est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrés les spicules formés par l'association entre la protéine SU/gp120 et la protéine TM/gp41. On retrouve aussi enchâssées dans l'enveloppe des protéines cellulaires telles que les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. La face interne de l'enveloppe est tapissée par les protéines de matrice (MA/p17) qui participent ainsi à la structure de la particule virale.

Le corps viral ou « core » se trouve au centre du virion et présente une géométrie conique typique constituée par des pentamères et hexamères de protéines de capsid (CA/p24). Le corps contient deux molécules d'ARN monocaténaire de polarité positive associées aux protéines de nucléocapsid (NC/p9), aux enzymes virales RT et IN et à des ARN de transfert ARN^tLys3 qui serviront d'amorces pour la transcription inverse.

Enfin, la particule virale renferme également la protéase virale (PR) ainsi que les protéines virales auxiliaires Vpr, Vif et Nef et les co-facteurs cellulaires comme la Cyclophiline A.

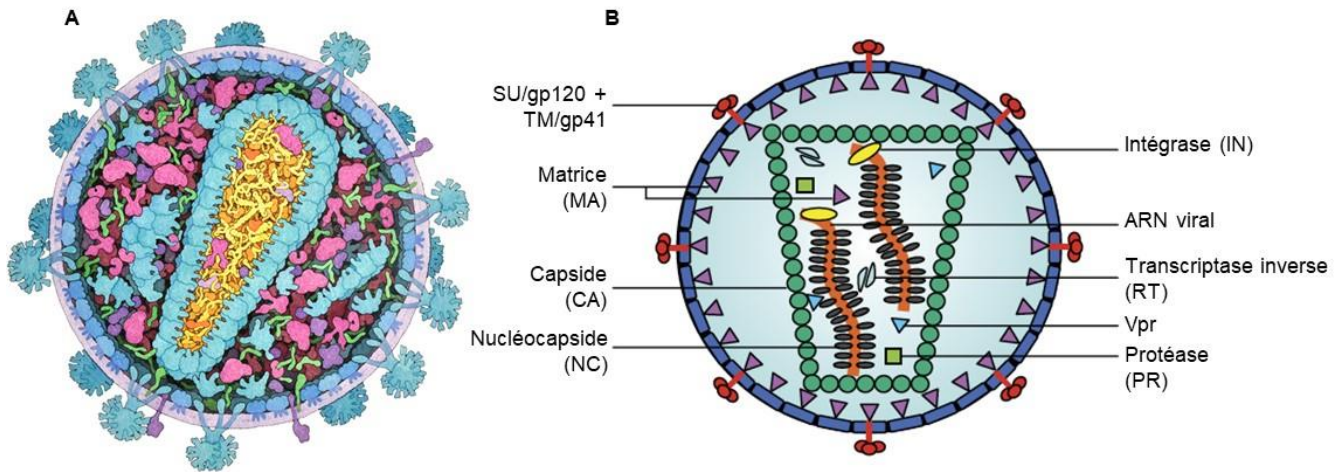


Figure 3. Structure et composition de la particule virale du VIH-1.

(A) Structure tridimensionnelle du virion (source <http://pdb101.rcsb.org>). **(B)** Schéma de l'organisation du virion.

1.2.2 Organisation du génome viral

Bien que le VIH-1 et le VIH-2 possèdent une homologie de séquence limitée (50% pour le gène *gag* et 60% pour le gène *pol*), leur organisation génomique, leur morphologie, leur composition protéique et leur mécanisme de réplication sont très similaires (Figure 4) (Gramberg et al., 2009).

La particule virale du VIH contient deux copies de l'ARNv coiffé et polyadénylé. Au cours du cycle de réplication l'ARNv est rétrotranscrit en ADNv puis intégré dans le génome de la cellule hôte, on parle de provirus. Le provirus intégré comporte environ 9 700 pb. De longues séquences répétées situées aux extrémités, les LTR, produites par duplication des régions U5 et U3 de l'ARNv au cours de la transcription inverse, sont essentielles à la réplication virale et contiennent les séquences d'attachement de l'IN ainsi que des séquences promotrices et régulatrices de la transcription.

Le génome est constitué de 10 gènes codant pour 18 protéines ou peptides, dont 6 protéines structurales et 3 enzymes. Une caractéristique partagée par les rétrovirus est la présence de gènes codant pour des polyprotéines précurseurs qui, après clivage protéolytique, donnent les différentes protéines maturées du VIH.

Le gène *Gag* (« group-specific antigen ») encode le précurseur Pr55^{Gag} de 55kDa, dont le clivage protéolytique donne naissance aux protéines MA, CA et NC. La MA forme une couche au niveau de la surface interne de l'enveloppe virale et permet l'ancrage de Pr55^{Gag} à la membrane plasmique lors de l'assemblage du virion. La CA forme la structure tridimensionnelle complexe qu'est la capside et qui protège l'ARNv. La NC est une protéine chaperonne qui stabilise l'ARNv à l'intérieur du virion. Les protéines CA et NC sont retrouvées dans le complexe ribonucléoprotéique (RTC) et

le complexe de pré-intégration (PIC). Pr55^{Gag} contient aussi la région p6 responsable du recrutement des protéines de la famille ESCRT lors du bourgeonnement de la particule. Enfin Pr55^{Gag} contient les peptides SP1 et SP2 qui interviennent lors de la protéolyse de Gag pour diriger l'ordre de clivage par la PR.

Le gène *Pro-Pol* encode la partie C-terminale du précurseur Pr160^{Gag-Pol} dont le clivage donne lieu aux trois enzymes virales : PR qui clive les précurseurs, RT formée par l'hétérodimère p51/p66 et qui possède une activité ADN polymérase et une activité RNaseH (« ribonuclease H ») et enfin IN qui intègre l'ARNv rétrotranscrit au génome cellulaire.

Le gène *Env* encode le précurseur glycosylé gp160, dont la maturation a lieu dans l'appareil de Golgi et donne lieu aux glycoprotéines de surface SU/gp120 et transmembranaire TM/gp41 associées en trimère à la surface des virions. Ce sont ces deux protéines qui forment les spicules viraux responsables de la reconnaissance de la cellule cible, de l'attachement à sa surface et de la fusion des membranes.

Le génome code aussi des protéines régulatrices : le facteur d'élongation de la transcription Tat (« transactivator of transcription ») est un activateur puissant de la transcription du provirus en ARNm et en ARN génomique ; et la protéine Rev participe à la traduction des protéines de structure et des enzymes virales, et à l'accumulation des molécules d'ARN génomique qui seront encapsidées dans les nouveaux virions.

Enfin, le génome du VIH contient aussi des gènes dits accessoires ou auxiliaires qui codent pour des protéines qui ne sont pas toujours requises pour la réplication virale *in vitro* mais jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'infection (Figure 4). Les deux virus partagent l'expression de la plupart des protéines auxiliaires :

La protéine Nef (« negative replication factor »). Elle participe à l'échappement du virus au système immunitaire en induisant la suppression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I de la membrane cellulaire (Schwartz et al., 1996). Elle diminue également l'expression du récepteur CD4 afin de réguler l'infection de la cellule (Bour et al., 1995) et empêche l'incorporation dans le virion des facteurs de restriction de la famille SERINC (« Serine incorporator »).

La protéine Vif (« virion infectivity factor ») contre le facteur de restriction APOBEC3G en induisant son ubiquitination et par conséquent sa dégradation par le protéasome.

La protéine Vpr (« viral protein R ») est présente dans la particule virale, elle est aussi un constituant du PIC. Elle participe à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en s'associant au co-facteur cellulaire SLX4.

Mais certaines protéines auxiliaires sont spécifiques à un virus uniquement :

La protéine Vpu (« viral protein U ») n'est exprimée que par le VIH-1. Elle est l'antagoniste premier du facteur de restriction Tetherin/BST2.

La protéine Vpx (« viral protein X ») n'est quant à elle exprimée que par le VIH-2. C'est en cherchant à identifier ses partenaires cellulaires que le facteur de restriction SAMHD1 a été découvert. Vpx provoque la dégradation de SAMHD1 par le protéasome en induisant son ubiquitination.

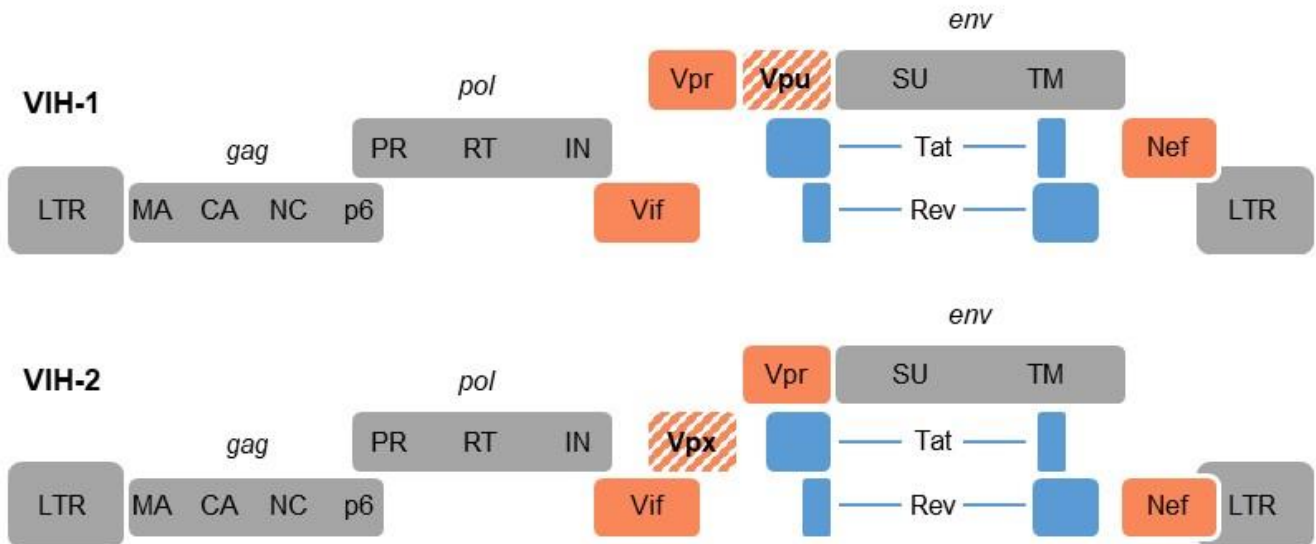


Figure 4. Représentation schématique du génome des VIH-1 et VIH-2.

Les gènes structuraux sont représentés en gris, les gènes régulateurs en bleu et les gènes accessoires en rose. La différence entre les deux génomes réside en l'expression de la protéine accessoire Vpu uniquement par le VIH-1 et l'expression de la protéine Vpx uniquement par le VIH-2.

1.3 Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication se divise arbitrairement en deux phases (Figure 5). La première est composée des étapes précoces et va de l'attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte jusqu'à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. L'ADN viral est alors appelé provirus. La deuxième phase, composée des étapes tardives, va de la transcription du provirus jusqu'à la libération des particules virales matures, capables d'infecter de nouvelles cellules pour propager l'infection.

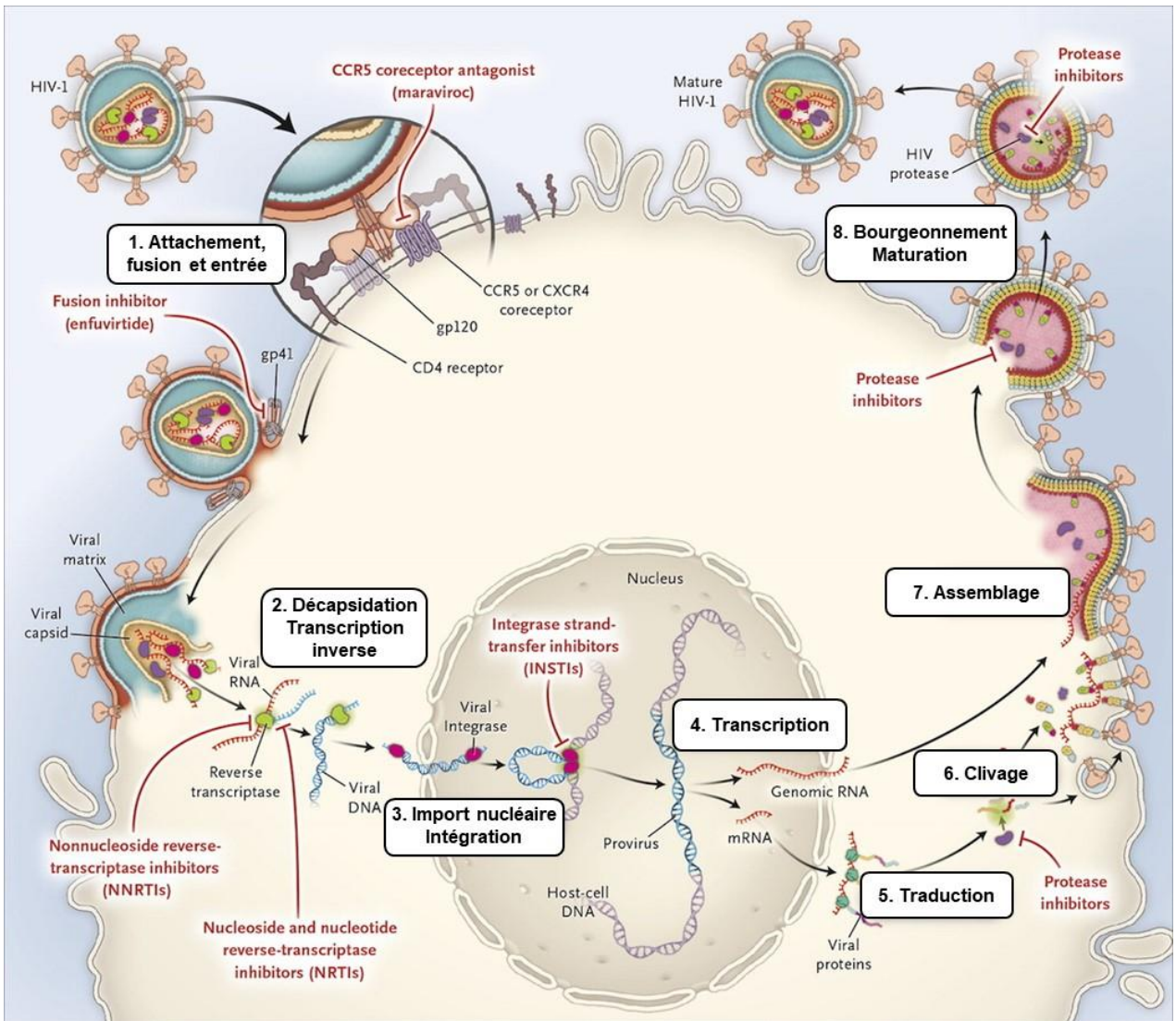


Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1 et sites d'action de six classes de molécules antirétrovirales.

Etape 1 : Attachement, fusion et entrée du virus dans la cellule hôte. En rouge, inhibiteurs de fusion et du co-récepteur CCR5. **Etape 2 :** Décapsulation et transcription inverse du génome viral ARN en ADN. En rouge, NNRTI et NRTI. **Etape 3 :** Import nucléaire et intégration de l'ADNv dans le génome de la cellule hôte. En rouge, inhibiteurs de l'intégrase. **Etapes 4 et 5 :** Transcription et traduction des protéines virales à l'aide de la machinerie cellulaire. **Etape 6 et 7 :** Clivage des précurseurs et assemblage du nouveau virion. En rouge, inhibiteurs de la protéase. **Etape 8 :** Bourgeoisement à la membrane et maturation puis libération de la nouvelle particule virale infectieuse. Adaptée de (Spach et al., 2016).

1.3.1 Attachement, fusion et entrée du virus

L'entrée du virus met en jeu l'interaction entre les glycoprotéines de surface du virus, appelées spicules viraux, avec un récepteur et un co-récepteur à la surface de la cellule cible (Figure 5 Etape 1). Le récepteur cellulaire qui reconnaît le VIH-1 est la molécule CD4, présente à la surface des lymphocytes T et des cellules de la lignée myéloïde (Maddon et al., 1986). Après avoir interagit avec CD4, la protéine virale SU/gp120 subit un changement conformationnel qui lui permet d'interagir avec le co-récepteur CCR5 ou CXCR4 (Berger et al., 1999). C'est à partir de ce co-récepteur que le tropisme cellulaire est défini. En effet, les souches virales dites T-tropiques ou X4 se répliquent efficacement dans les lignées de cellules T et de lymphocytes qui exposent à leur surface le co-récepteur CXCR4 (« C-X-C chemokine receptor type 4 », tropisme X4). Les souches virales dites M-tropiques ou R5 se répliquent efficacement dans les macrophages et les lymphocytes T qui expriment le co-récepteur CCR5 (« C-C chemokine receptor type 5 », tropisme R5). Enfin certaines souches virales, R5X4, peuvent reconnaître les deux co-récepteurs.

La liaison au co-récepteur induit le démasquage du peptide de fusion de la TM/gp41 et son insertion dans la membrane de la cellule hôte. S'ensuit le rapprochement et la fusion des membranes lipidiques virale et cellulaire qui permet *in fine* la libération de la capsid virale dans le cytoplasme (Wilén et al., 2012).

Le virus du VIH a mis en place d'autres moyens pour entrer dans la cellule hôte. Des études montrent qu'il emploie une voie ressemblant à la macropinocytose et qui semble être dépendante du co-récepteur CCR5 (Carter et al., 2011; Gobeil et al., 2013; Marechal et al., 2001). Carter et al définissent ce mode d'entrée comme PHEEM pour « Pathway of HIV Endocytic Entry in Macrophages » (Carter et al., 2011). De plus, une étude suggère l'existence d'une interaction entre la glycoprotéine SU/gp120 du VIH-1 et les récepteurs cellulaires DC-SIGN et L-SIGN présents à la surface des cellules dendritiques (Geijtenbeek et al., 2000). Cette interaction serait notamment à l'origine de la transmission verticale du virus, de la mère à l'enfant (Celerino da Silva et al., 2011).

1.3.2 Décapsidation et transcription inverse

La décapsidation, qui correspond au démantèlement de la capsid virale, est un mécanisme dont la dynamique est encore débattue (Figure 5 Etape 2) (Greber et al., 1994). Il se pourrait que ce désassemblage ait lieu rapidement ou alors progressivement pour s'étendre jusqu'à l'étape de l'import nucléaire (Campbell et Hope, 2015). Bien que le paramètre temporel qui définit la décapsidation soit inconnu, on sait qu'un bon déroulement de cette étape est requis pour la transcription inverse et l'intégration.

La transcription inverse est l'étape au cours de laquelle le génome viral ARN est rétrotranscrit en ADN complémentaire double brin par la RT (Figure 6). La RT est un hétérodimère possédant deux activités : la sous-unité p55 est une ADN polymérase ARN et ADN dépendante ; la sous-unité p66 est une RNaseH qui dégrade l'ARN des duplexes ARN/ADN. Dans la cellule infectée, la transcription inverse a lieu au sein du RTC, composé de protéines virales et cellulaires ainsi que des acides nucléiques viraux (Hu et Hughes, 2012).

L'amorce qu'utilise la RT pour synthétiser le premier brin d'ADN (brin négatif) est l'ARNt cellulaire Lys3 dont l'extrémité 3' est complémentaire d'une séquence située à proximité de l'extrémité 5' de l'ARNv appelée PBS (« Primer Binding Site »). Les extrémités de l'ARNv sont des séquences répétées directes, appelées R, qui permettent de transférer le brin négatif d'ADN néo-synthétisé à l'extrémité 3' de l'ARNv.

De manière concomitante, l'activité RNaseH de la RT dégrade le brin matrice ARN, à l'exception de la séquence ppt (« polypurine tract ») qui sert d'amorce pour l'initiation de la synthèse du brin d'ADN positif. En plus de synthétiser le brin positif, la RT copie les 18 premiers nucléotides de l'ARNt Lys3, puis ce dernier devient lui aussi un substrat de la RNaseH qui ne laisse qu'un seul ribonucléotide A à l'extrémité 5'. L'ADNc ainsi obtenu est plus long que l'ARN matrice car ses extrémités sont constituées des séquences des extrémités de l'ARN, on parle de LTR pour « long terminal repeats ».

Un challenge auquel fait face le VIH est la réserve limitée en dNTP dans les cellules quiescentes ou non-cyclantes. On sait que les VIH-2 et SIV se répliquent rapidement dans ces cellules grâce à la protéine auxiliaire Vpx qui induit la dégradation d'un facteur cellulaire responsable de la diminution de la concentration des dNTP, appelé SAMHD1, et dont l'étude fait l'objet de cette thèse. Ainsi, la RT de ces virus peut fonctionner normalement. Le VIH-1, quant à lui, n'exprime pas Vpx et pour pallier ce problème il a su adapter l'activité de sa RT, capable de fonctionner à de faibles concentrations de dNTP dans les macrophages alors que dans cet environnement les RT des VIH-2 et SIV ne sont pas fonctionnelles (Kim et al., 2012; Lenzi et al., 2014, 2015). Lenzi et al montrent que la constante de Michaelis (K_m) de la RT du VIH-1 est en moyenne 10 fois plus basse que la K_m des RT du VIH-2 et de certains SIV, suggérant que ces derniers possèdent une RT qui requiert de fortes concentrations en dNTP pour atteindre son activité maximale. La constante catalytique (k_{cat}) n'est quant à elle pas différente entre les RT des différents virus suggérant que le turnover de substrat des RT est conservé à travers les virus. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la RT du VIH-1 est catalytiquement plus efficace que celles des VIH-2 et SIV, particulièrement dans un environnement où la concentration en dNTP est faible. On peut expliquer cela par le fait que la pression de sélection imposée aux virus pour que leur RT fonctionne de manière optimale en condition de faibles concentrations en dNTP est levée par la présence de Vpx (pour les VIH-2 et SIV), contrairement au VIH-1 qui se doit d'être efficace dans un tel environnement.

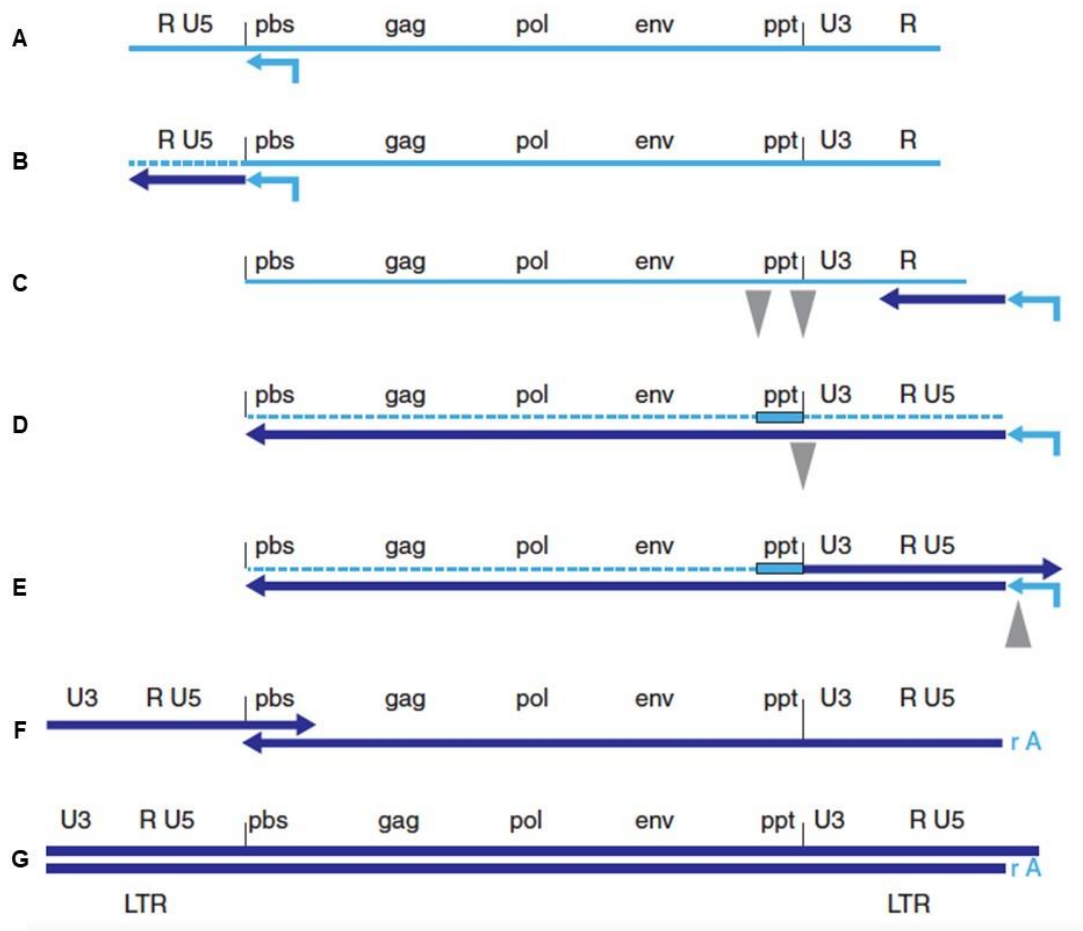


Figure 6. Etape de transcription inverse.

(A) Génome ARN viral (bleu clair) avec une amorce ARNt appariée au PBS à l'extrémité 5'. (B) La RT initie la transcription inverse et génère un brin négatif d'ADN (bleu foncé). L'activité RNaseH de la RT dégrade le brin matrice (pointillés bleu clair). (C) Le brin négatif d'ADN est transféré à l'autre extrémité du génome et (D) sa synthèse continue en même temps que la dégradation de l'ARN. (E) La séquence ppt résiste à la dégradation par la RNaseH et sert d'amorce pour la synthèse du brin positif d'ADN jusqu'aux 18 premiers nucléotides de l'ARNt. La RNaseH retire ensuite l'amorce ARNt. (F) Le brin positif d'ADN est transféré à l'autre extrémité et sa synthèse continue pour mener (G) à l'ADN virale double brin complet. Tirée de (Hu et Hughes, 2012).

1.3.3 Import nucléaire et intégration du génome viral

Pendant l'étape de transcription inverse, le complexe RTC est progressivement acheminé en périphérie du noyau grâce au réseau de microtubules (McDonald et al., 2002) et s'accumule au niveau du centrosome (Figure 5 Etape 3) (Zamborlini et al., 2007). Récemment, il a été montré que l'interaction de l'intégrase du VIH avec DYNLL1 (« Dynein light chain 1 ») est essentielle pour le bon déroulement de la décapsidation, et de la transcription inverse du virus (Jayappa et al., 2015). Les

dynéines sont des complexes protéiques associés aux microtubules qui permettent le transport de macromolécules dans le cytoplasme (Mallik et al, 2004 *Current Biology*).

Le complexe RTC laisse alors place au complexe de pré-intégration ou PIC qui protège l'ADNv rétrotranscrit et qui dirige son entrée dans le noyau. Une des caractéristiques principales des Lentivirus est leur capacité à utiliser les machineries cellulaires d'import nucléaire afin de ne pas dépendre de la mitose, c'est pourquoi ils sont capables de se répliquer dans les cellules qui ne se divisent pas (Lewis et Emerman, 1994).

Le PIC contient l'ADNv associé aux protéines virales IN, MA, CA, NC et Vpr. Pour être activement transporté dans le noyau, le PIC doit passer par les pores nucléaires (Bukrinsky et al., 1992) mais le mécanisme qu'il emploie reste mal connu. Des pistes pour comprendre cette translocation indiquent que les protéines virales IN, MA et Vpr possèdent dans leur séquence des signaux de localisation nucléaire. De plus, l'IN interagit avec des importines comme l'importine 7 qui facilitent l'entrée nucléaire (Christ et al., 2008; Fassati, 2003). Enfin, les protéines virales CA et IN engagent aussi des interactions avec les protéines du complexe du pore nucléaire comme les nucléoporines Nup153, -98, -62 et -358 ainsi que la transportine SR-2/TNPO3 (Matreyek et Engelman, 2011; Ocwieja et al., 2011).

L'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte garantit l'expression des gènes viraux à long terme ainsi que la persistance du provirus qui est transmis aux cellules filles au cours des divisions (Figure 5 Etape 3). D'un point de vue biochimique l'intégration comporte deux réactions catalysées par la protéine virale IN. La première, dite de « 3'-processing », a lieu dans le cytoplasme et correspond au clivage d'un dinucléotide conservé à l'extrémité 3' de l'ADNv résultant en l'exposition d'extrémités hydroxyles (David Pauza, 1990). La deuxième réaction est le transfert de brin et a lieu après la translocation du PIC dans le noyau. L'ADNv clivé lors de la première réaction sert de substrat à l'IN qui utilise les extrémités hydroxyles pour insérer de manière covalente le provirus dans le génome cellulaire.

L'intégration du provirus dans des régions transcriptionnellement actives est possible grâce à l'interaction de l'IN avec le co-facteur LEDGF/p75 (Cherepanov et al., 2003; Emiliani et al., 2005) qui est responsable de l'ancrage à la chromatine (Hare et Cherepanov, 2009). LEDGF/p75 s'attache d'un côté à la chromatine et de l'autre à l'intégrase pour diriger l'intégration de l'ADNv dans des gènes actifs (Ciuffi et al., 2005).

1.3.4 Transcription et traduction du provirus

La transcription et la traduction du provirus dépendent à la fois de l'activité de protéines virales régulatrices et de la coopération de facteurs cellulaires (Figure 5 Etapes 4 et 5).

La transcription des premiers ARN messagers (ARNm) viraux, appelés transcrits précoces, est amorcée par des facteurs de transcription cellulaires et dirigée par l'ARN polymérase II. Les transcrits précoces sont multi-épissés et codent les protéines Tat, Rev et Nef. La transcription s'amplifie ensuite sous l'action de la protéine trans-activatrice virale Tat qui est importée, avec Rev, dans le noyau après la traduction. Tat favorise l'élongation de la transcription grâce à l'interaction avec la séquence TAR (« Trans-activation response element »), une région ayant une structure stable en épingle à cheveux et qui se situe en aval du LTR 5' des transcrits précoces. Tat recrute ensuite le complexe positif d'élongation de la transcription p-TEFb composé de la kinase CDK9 et de la cycline T1. En absence de Tat, l'élongation de la transcription est fortement inhibée par le facteur NELF (Zhang et al., 2007). La phosphorylation de NELF lève cette restriction en dissociant ce dernier de la séquence TAR (Fujinaga et al., 2004).

La maturation et l'épissage des ARNm ainsi transcrits conduisent à différents types d'ARNm. Comme indiqué plus haut, les ARN multi-épissés peuvent sortir du noyau et sont pris en charge par les ribosomes cellulaires pour produire les protéines régulatrices Tat, Nef et Rev. Cette dernière joue un rôle primordial dans l'export vers le cytoplasme des ARNm viraux contenant des introns ; les ARNm partiellement épissés codant les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr ; et les ARNm non épissés codant les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol. Ce dernier type d'ARNm sert également d'ARN génomique viral encapsidé dans les virions nouvellement produits.

La protéine Rev permet en effet de déjouer le « contrôle-qualité » imposé par la cellule, qui séquestre dans le noyau les transcrits contenant des introns afin d'éviter la traduction de protéines non-fonctionnelles (Fischer et al., 1994; Pollard et Malim, 1998). La fixation à l'élément RRE (« Rev-responsive element ») situé dans le gène *Env*, induit l'exposition et l'activation du NES (« nuclear export signal ») de Rev qui interagit avec CRM-1 (« Chromosomal Maintenance 1 »). Cette dernière se lie à des protéines cargo et à la protéine Ran-GTPase et permet l'export des transcrits viraux vers le cytoplasme (Fornerod et al., 1997). Après l'export, ce complexe est déstabilisé par les protéines RanGAP et RanBP1, permettant à Rev d'entrer de nouveau dans le noyau en interagissant avec l'importin- β (Henderson et Percipalle, 1997).

Les ARNm viraux sont traduits dans le cytoplasme à l'exception du précurseur Env/gp160 qui est synthétisé et glycosylé dans le réticulum endoplasmique. En suivant le trafic du système endolysosomal, il atteint ensuite l'appareil de Golgi où des endoprotéases telles que la furine, le clivent en protéines maturées SU/gp120 et TM/gp41. Ces deux glycoprotéines qui sont ensuite exportées à la membrane plasmique et sont incorporées dans l'enveloppe des virions néo-formés au niveau des sites d'assemblage (Otteken et al., 1996).

1.3.5 Assemblage, bourgeonnement et maturation de la particule virale

L'assemblage des particules virales est initié par le précurseur polyprotéique Pr55^{Gag}. Le domaine MA permet l'adressage de Pr55^{Gag} sous la membrane plasmique grâce à sa myristoylation. La protéine MA est aussi requise pour l'incorporation des protéines d'enveloppe dans les nouveaux virions (Yu et al., 1992). Le domaine CA est responsable de la multimérisation de Pr55^{Gag} et de l'incorporation du précurseur Gag-Pol dans le virion. Le domaine NC interagit avec l'ARNv et permet son empaquetage dans le virion. D'autres protéines et co-facteurs cellulaires sont recrutés lors de l'assemblage pour être incorporés dans le virion tels que l'ARNt Lys3 cité plus haut, et la Cyclophiline A qui permet de stabiliser la capsid. Enfin, le domaine p6 est impliqué dans le processus de détachement de la particule virale bourgeonnante grâce à son interaction avec les protéines de la famille ESCRT (« Endosomal Sorting Complex Required for Transport »). L'assemblage et le bourgeonnement des particules virales n'a pas toujours lieu à la membrane plasmique. Dans certains types cellulaires, comme les cellules épithéliales et les macrophages, les particules virales s'assemblent au niveau de la membrane des endosomes tardifs et sont libérées par exocytose (Grigorov et al., 2006; Mariani et al., 2014).

La particule virale ainsi libérée est immature et gagne son pouvoir infectieux après maturation des précurseurs viraux (Figure 5 Etapes 7 et 8). Cette maturation commence par l'auto-clivage de la protéine PR à partir du précurseur Pr160^{Gag-Pol}. Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la PR donne ensuite les protéines de structure et les enzymes virales (Figure 5 Etape 6). S'ensuit une modification architecturale selon laquelle la protéine CA s'auto-organise en une structure complexe de pentamères et d'hexamères pour former la capsid de géométrie conique qui englobe le complexe ribonucléoprotéique comprenant les deux molécules d'ARN génomiques viraux et associé à la NC.

2/ Les facteurs de restriction, gardiens de la cellule hôte contre les Rétrovirus

2.1 Caractéristiques et découverte des facteurs de restriction du VIH-1

Afin de se répliquer efficacement et de se disséminer, les virus doivent échapper aux systèmes de défense de l'hôte. La première ligne de défense contre les pathogènes est constituée de protéines cellulaires qui possèdent une activité antivirale et sont appelés facteurs de restriction. En réponse à ces facteurs de restriction, les virus s'adaptent aussi. Cette lutte incessante a pour effet de modifier les fonctions des protéines cellulaires, des protéines virales et des génomes cellulaire et viral.

Un facteur de restriction possède les caractéristiques suivantes (Ballana et Esté, 2015; Blanco-Melo et al., 2012; Duggal et Emerman, 2012; Malim et Bieniasz, 2012) :

1. une fonction antivirale puissante qui ne requiert pas l'intervention de co-facteurs la plupart du temps (action autonome)
2. une expression constitutive, mais qui peut être augmentée par l'interféron (IFN)
3. une activité dominante
4. il est souvent contré par une protéine virale ou un mécanisme d'échappement viral
5. il montre les signatures d'une évolution génétique positive due à un conflit avec son antagoniste viral (on parle de sélection positive)
6. ses fonctions ou sa régulation impliquent le système cellulaire ubiquitine/protéasome

Etant donné que les facteurs de restriction peuvent causer des changements drastiques dans la cellule, comme par exemple des mutations dans les acides nucléiques ou la modification de l'activité des protéines, leur activité doit être finement régulée afin que leur action ne soit pas délétère pour la cellule (Duggal et Emerman, 2012).

L'activité antivirale d'un facteur de restriction est démontrée expérimentalement soit en sur-exprimant la protéine, ce qui cause une baisse d'infectiosité, soit en inhibant son expression ce qui cause l'augmentation de la réplication virale. Un facteur de restriction peut avoir un large spectre d'action, inhibant des virus appartenant à différentes familles, c'est le cas de Tetherin/BST2 qui peut contrer l'infection des virus enveloppés (Le Tortorec et al., 2011), ou alors une action ciblée comme dans le cas de TRIM5 α qui restreint spécifiquement les rétrovirus (Johnson et Sawyer, 2009). Bien que le nombre de facteurs de restriction augmente constamment (Ghimire et al., 2018), je n'aborderai dans ce manuscrit que ceux dont les mécanismes d'activité antivirale ont été étudiés de manière plus approfondie (voir tableau).

Tableau I. Récapitulatif des facteurs de restriction anti-VIH-1 décrits dans ce manuscrit avec indication de l'étape du cycle de réplication sur laquelle ils agissent et leurs antagonistes viraux.

Facteur de restriction	Etape du cycle viral inhibée	Antagoniste viral
APOBEC3G	Transcription inverse	Vif
TRIM5a	Décapsidation	aucun connu
Tetherin/BST2	Bourgeonnement	Vpu
MxB	Import nucléaire de l'ADN viral	aucun connu
SERINC5	Fusion de l'enveloppe à la membrane cellulaire	Nef (et Env)

Fv1 (« Friend virus susceptibility 1 ») a été le premier gène identifié comme conférant aux cellules de souris une résistance au virus de la leucémie murine (MLV) (Lilly, 1967). Les deux allèles du gène, *Fv1ⁿ* et *Fv1^b*, sont responsables de l'inhibition de l'infection par les souches B et N du MLV respectivement (Lilly, 1967). Les souris hétérozygotes *Fv1^{n/b}* acquièrent la résistance aux deux souches virales démontrant le caractère dominant du gène. La protéine *Fv1*, codée par ce gène, possède une grande similarité de séquence avec la poly-protéine Gag des rétrovirus endogènes (Best et al., 1996). Sa capacité à contrer le MLV viendrait de l'interaction directe avec la capsid du virus. De plus, l'activité antivirale de *Fv1* est saturable par des doses croissantes de virus (Bassin et al., 1978 ; Duran-Troise et al., 1977). Enfin, une étude s'intéressant à l'évolution du gène *Fv1*, indique que la protéine inhibe aussi la réplication de lentivirus comme l'EIAV (« Equine Infectious Anemia Virus ») et de spumavirus comme le FFV (« Feline Foamy Virus ») (Yap et al., 2014).

La caractérisation de *Fv1* a pris tout son sens quand l'homologue humain *Ref1* a été identifié comme étant aussi capable de restreindre l'infection par le N-MLV suggérant une conservation du mécanisme chez les mammifères (Besnier et al., 2003; Towers et al., 2000, 2002). Par la suite, il a été découvert que de nombreuses lignées cellulaires humaines bloquent l'infection par le VIH-1 et de manière saturable également (Hofmann et al., 1999; Towers et al., 2000). Le phénotype *Ref1* a ensuite été décrit comme étant le facteur de restriction TRIM5 α .

Cette découverte a été soutenue par la mise en place de l'approche expérimentale suivante : une cellule non permissive est fusionnée à une cellule permissive pour former un hétérocaryon et la capacité de ce dernier à inhiber l'infection est ensuite mesurée (Figure 7). Lorsque le phénotype est restrictif alors la présence d'un facteur dominant est envisagée, alors qu'une sensibilité de l'hétérocaryon à l'infection suggère la perte d'un co-facteur présent initialement dans la cellule non permissive (Malim et Bieniasz, 2012).

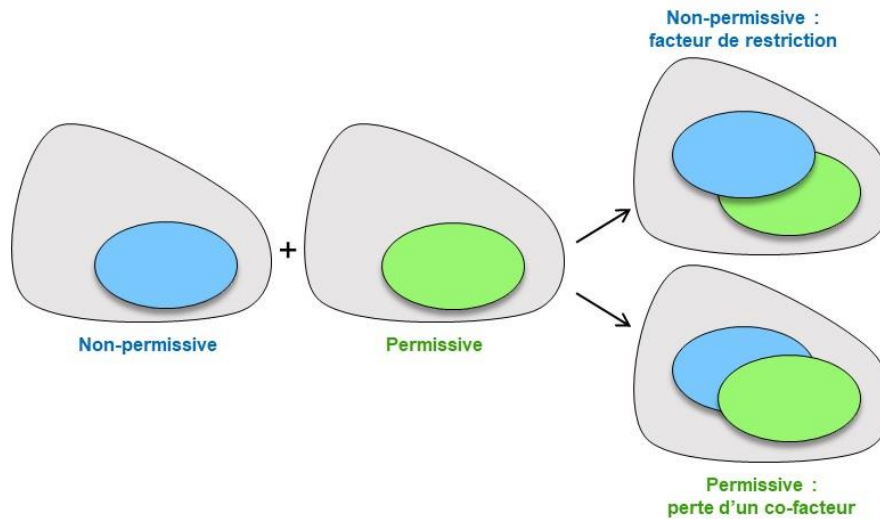


Figure 7. Principe de la fusion cellulaire ou hétérocaryon.

Les deux cellules sont fusionnées et forment un hétérocaryon qui exprime le matériel de chacune. Quand l'hétérocaryon restreint l'infection par le VIH-1, la présence d'un facteur de restriction est envisagée (cas bleu). Si l'hétérocaryon est permissif à l'infection, on en déduit qu'un co-facteur provenant de la cellule initialement non-permissive a été perdu (cas vert).

Deux approches expérimentales ont ensuite été mises en place pour identifier des gènes codant pour des facteurs de restriction : la première consiste en des études comparatives de transcriptomique pour identifier les gènes exprimés préférentiellement dans les cellules résistantes par rapport aux cellules permissives. La seconde consiste à exprimer, dans des cellules permissives, une banque d'ADNc provenant de cellules résistantes puis d'isoler les gènes capables de conférer cette résistance aux cellules permissives. APOBEC3G, Tetherin et SERINC ont été identifiés par la première méthode (Neil et al., 2008 ; Sheehy et al., 2002) alors que la deuxième a permis l'identification de TRIM5 α (Stremlau et al., 2004).

Au-delà de leur identification, les avancées majeures concernant les facteurs de restriction impliquent l'élucidation de leurs mécanismes d'action, l'identification de leurs antagonistes viraux (Figure 8) et leurs moyens d'y échapper ainsi que la prise en compte d'une co-évolution perpétuelle (Malim et Bieniasz, 2012).

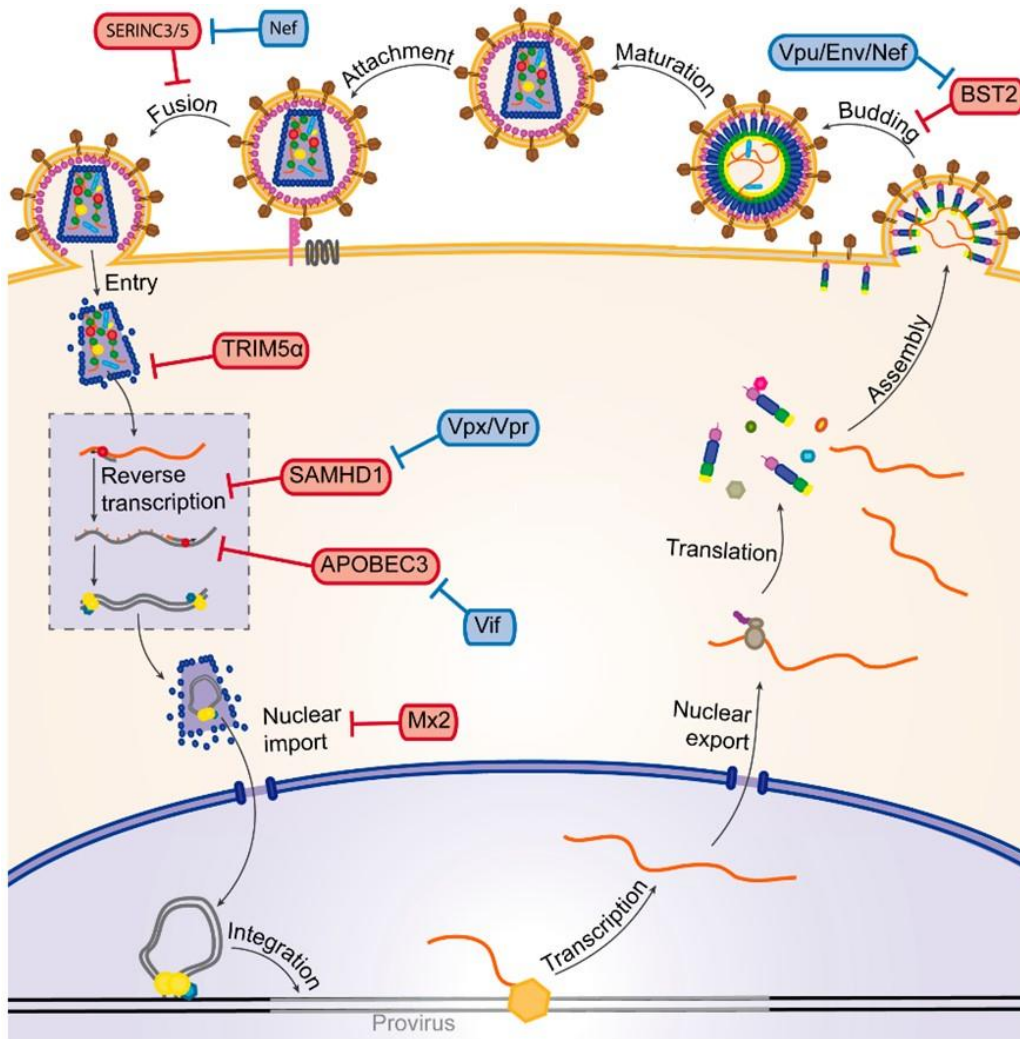


Figure 8. Action des principaux facteurs de restriction sur les étapes du cycle de réplication du VIH. Les facteurs de restriction apparaissent en rouge et leur antagoniste viral sont représentés en bleu. Tirée de (Seissler et al., 2017).

2.2 Mode d'action des facteurs de restriction et relations avec leurs antagonistes viraux

2.2.1 La protéine TRIM5α

Le VIH-1 se réplique efficacement dans les cellules humaines mais sa réplication est bloquée dans les cellules des singes de l'Ancien Monde (Besnier et al., 2003). Au contraire, d'autres lentivirus de primates comme le VIS_{mac239}, se répliquent bien dans les cellules des singes de l'Ancien Monde mais peu efficacement dans les cellules des singes du Nouveau Monde (Hofmann et al., 1999). Une exception est à noter pour le Douroucouli (ou « Owl monkey ») qui est un singe du Nouveau Monde dont les cellules sont résistantes au VIH-1 mais pas aux VIS (Hofmann et al., 1999).

Le crible d'une banque d'ADNc visant à identifier le gène responsable de la restriction du VIH-1 dans les fibroblastes de singe Rhésus (singe de l'Ancien Monde) a permis d'isoler le gène *TRIM5α* (Stremlau et al., 2004). Il s'agit d'un membre de la famille des protéines TRIM (« Tripartite Motif ») qui partagent une même organisation structurale (Figure 9). La région N-terminale comprends (Nisole et al., 2005) : un domaine RING possédant une activité Ubiquitine E3 ligase (Diaz-Griffero et al., 2006), une ou deux B-box, qui sont exclusivement trouvées chez les protéines TRIM (Diaz-Griffero et al., 2009), et un domaine coiled-coil responsable de son oligomérisation (Peng et al., 2000). La région C-terminale de *TRIM5α* comporte un domaine SPRY/B30.2 responsable de son interaction avec la capside des rétrovirus (Perez-Caballero et al., 2005).

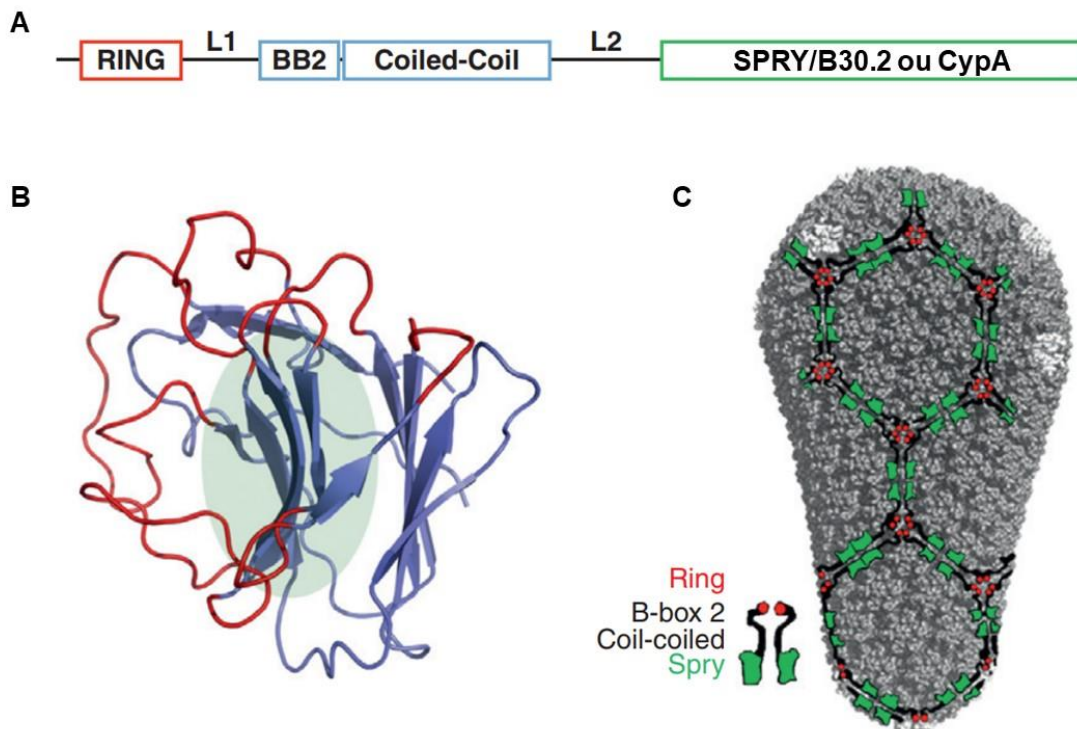


Figure 9. Structure de TRIM5α.

(A) Représentation schématique des domaines de *TRIM5α* : le domaine RING en N-terminal, BB2 pour la B-box, le coiled-coil, le domaine SPRY/B30.2 en C-terminal qui peut être remplacé par la Cyclophiline A, et L1 et L2 pour les linkers. **(B)** Structure tridimensionnelle de *TRIM5α* représentée en rubans. Les boucles variables sont en rouge et la poche hydrophobe qui sert à l'interaction est en vert pâle. **(C)** Modèle de la capside du VIH-1 associée à la matrice hexagonale formée des protéines *TRIM5α*. Tirée de (Grütter et Luban, 2012).

TRIM5α possède une activité de restriction espèce-spécifique et constitue donc une barrière à la transmission croisée des rétrovirus. C'est le domaine SPRY/B30.2 qui est le déterminant de la spécificité des différentes protéines *TRIM5α* par rapport aux différents rétrovirus, en l'occurrence une région de 13 acides aminés ayant subi une sélection positive (Perez-Caballero et al., 2005; Sawyer et al., 2005). *TRIM5α* humaine restreint efficacement les virus N-MLV et EIAV mais faiblement le

VIH-1. Alors que l'orthologue simien, TRIM5 α Rhésus, restreint le VIH-1, le N-MLV mais n'agit pas contre le VIS_{mac}. Le déterminant viral qui définit la sensibilité aux isoformes de TRIM5 α est la protéine rétrovirale de la CA, en particulier l'acide aminé en position 88.

Comme indiqué plus haut, le Douroucouli est la seule espèce de singe du Nouveau Monde dont les cellules sont résistantes à l'infection par le VIH-1 (Towers et al., 2003). Cette inhibition est attribuée à la protéine TRIM-Cyp qui résulte de la rétrotransposition du gène codant la Cyclophiline A (CypA) entre les exons 7 et 8 du gène *TRIM5 α* , remplaçant ainsi le domaine SPRY/B30.2 (Nisole et al., 2004; Sayah et al., 2004; Stoye et Yap, 2008). CypA peut se lier à la capsid de divers lentivirus et permet ainsi à la protéine de fusion TRIM-Cyp d'agir comme un facteur de restriction, tout comme le fait TRIM5 α .

De manière intéressante, la protéine TRIM-Cyp décrite dans le Douroucouli (omTRIM-Cyp) n'est pas unique. En effet, une seconde protéine de fusion similaire est apparue de manière indépendante chez trois espèces de macaques (rhTRIM-Cyp) : *Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina* et *Macaca fascicularis* (Brennan et al., 2008; Virgen et al., 2008; Wilson et al., 2008). Après rétrotransposition, la protéine Cyp A s'est insérée dans la région non traduite de l'exon 8 de TRIM5 α . La protéine de fusion rhTRIM-Cyp n'a pas d'action contre le VIH-1 mais peut contrer le VIH-2, le VIS de l'AGM (« African green monkey ») et le FIV (« Feline Immunodeficiency Virus ») (Virgen et al., 2008; Wilson et al., 2008). Cette différence de propriété antivirale vient de deux mutations (D66N et R69H) qui lui permettent de discriminer le VIH-1 du VIH-2 et augmente son affinité pour ce dernier (Price et al., 2009). Tout comme TRIM5 α et omTRIM-Cyp, la restriction par rhTRIM-Cyp provient de son interaction avec la capsid virale (Virgen et al., 2008).

Le mode d'action antiviral de TRIM5 α est le suivant : TRIM5 α interagit avec la structure tridimensionnelle de la capsid virale lors de sa pénétration dans le cytoplasme (Figure 9) (Zhao et al., 2011), induit sa désintégration de manière prématurée (Stremlau et al., 2006) et empêche ainsi le déroulement des étapes ultérieures de l'infection. Il a aussi été suggéré que TRIM5 α agisse comme un PRR (« Pathogen Recognition Receptor »). En effet, la reconnaissance de la capsid virale (ou PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Pattern »), conduit à l'activation d'une voie de signalisation de l'immunité innée (Pertel et al., 2011) déclenchée par la synthèse de chaînes poly-ubiquitine K63 résultant de l'activité Ubiquitine E3 ligase de TRIM5 α . L'activation de TAK1 qui en découle induit les voies de signalisation AP-1 et NF κ B. Jusqu'ici, aucune protéine virale n'a été identifiée comme antagoniste de TRIM5 α .

2.2.2 APOBEC3G et son antagoniste viral Vif

APOBEC3G fait partie de la famille des protéines APOBEC pour « Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like ». Ces protéines présentent un panel large de fonctions importantes chez l'Homme. Comme leur nom l'indique, elles ont la capacité de fixer l'ARN et l'ADN et d'éditer le génome en induisant la désamination de la cytidine en uridine, générant ainsi des mutations (Salter et al., 2016).

C'est en étudiant la protéine virale Vif du VIH-1 qu'APOBEC3G a été découverte. En effet il était déjà connu que la présence de Vif dans le virion n'est pas nécessaire pour infecter efficacement des lignées cellulaires lymphocytaires permissives (SupT1 et CEM-SS), alors qu'elle est indispensable pour l'infection d'autres lignées non-permissives (HUT78 et CEM) et des lymphocytes T CD4+ primaires (Gabuzda et al., 1992). Partant de ce constat, l'expérience avec un hétérocaryon (comme cité plus haut) entre des cellules non-permissives H9 et des cellules permissives HeLa (Madani et Kabat, 1998) ainsi qu'une analyse transcriptomique ont permis d'identifier APOBEC3G comme facteur cellulaire neutralisé par Vif (Sheehy et al., 2002).

APOBEC3G restreint le VIH-1 en augmentant le taux de désamination des cytosines en uridines dans le brin anti-sens de l'ADN viral, ce qui résulte en l'hyper-mutation des guanines en adénines dans le brin sens durant les premières étapes de la transcription inverse (Figure 10) (Mangeat et al., 2003). Ainsi la fonctionnalité du génome viral est compromise avant même son intégration (Yu et al., 2004). En absence de Vif, APOBEC3G est incorporée au virion grâce à son interaction avec la nucléocapside du virus qui lui permettrait ainsi une action rapide sur les étapes précoces du cycle de réplication (Mangeat et al., 2003). La pression de sélection imposée au virus par APOBEC3G pourrait expliquer que le génome du VIH-1 est riche en adénines (40%) mais pauvre en cytidines (16%) (Berkhout et Hemert, 1994).

Dans la cellule infectée, Vif interagit avec APOBEC3G et recrute simultanément le complexe Cullin5 Elongin B/C Ubiquitine E3 ligase. Cela entraîne l'ubiquitination d'APOBEC3G puis sa dégradation par le protéasome et prévient ainsi son incorporation dans le virion (Figure 10) (Yu et al., 2003). L'interaction entre APOBEC3G et Vif est spécifique de l'espèce : APOBEC3G de l'AGM est résistante à la protéine Vif du VIH-1 et inversement, puisque la protéine Vif du VIS de l'AGM ne peut pas induire la dégradation de l'APOBEC3G humaine (Bogerd et al., 2004; Xu et al., 2004; Schröfelbauer et al., 2004).

APOBEC3G n'est pas la seule protéine de sa famille à restreindre le virus du VIH-1 : une activité antivirale a été identifiée pour APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3F et APOBEC3D/E (Bishop et al., 2004). Des travaux montrent que l'activité désaminase des enzymes APOBEC est parfois superflue pour leur activité antivirale suggérant qu'elles possèdent un autre mode de restriction (Newman et al., 2005). Pour autant, ces données sont controversés car les

approches expérimentales menées *in vitro* ne sont pas transposables aux conditions physiologiques *in vivo* (Miyagi et al., 2007).

L'action des protéines de la famille APOBEC ne se restreint pas qu'aux rétrovirus : APOBEC3G, -3F et -3B sont capables de bloquer la réplication du virus de l'hépatite B soit en interférant avec l'empaquetage du génome pré-ARN dans la particule virale (Turelli, 2004) soit en utilisant leur activité enzymatique désaminase (Noguchi et al., 2005). Enfin les protéines APOBEC peuvent également restreindre la rétrotransposition des rétro-éléments LINE-1 (« Long interspersed nuclear elements »), Alu, MusD et IAP (Esnault, 2006; Hulme et al., 2007; Muckenfuss et al., 2006). Ces caractéristiques sont communes à SAMHD1, le facteur de restriction sur lequel porte l'étude présentée dans ce manuscrit.

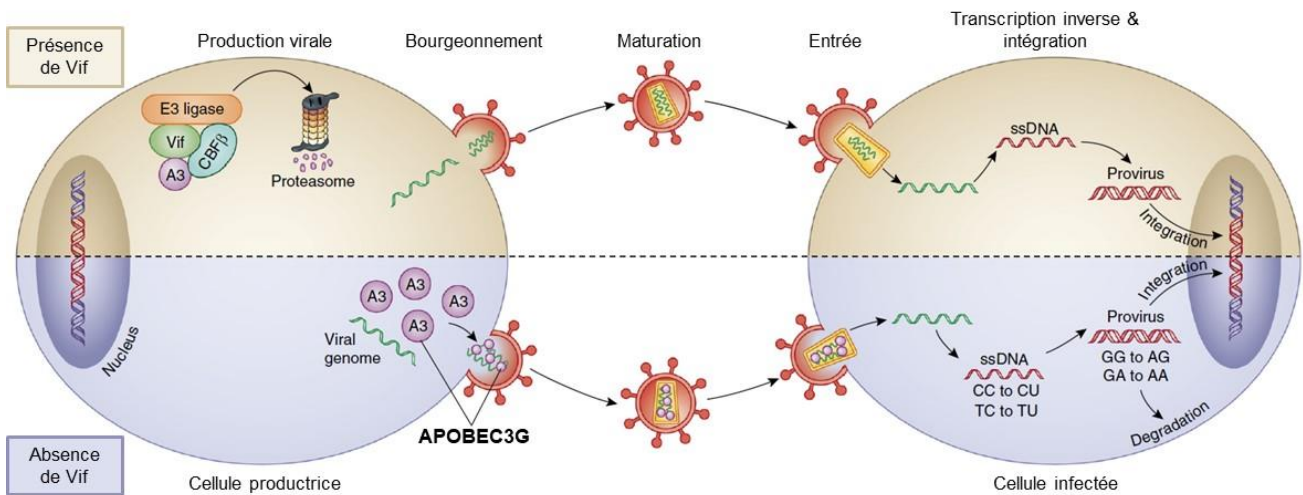


Figure 10. Mode d'action d'APOBEC3G et de son antagoniste viral Vif.

(Haut) En présence de Vif, APOBEC3G (A3) est dégradée par le protéasome dans la cellule productrice via le recrutement d'un complexe ubiquitin E3 ligase. Le virion ainsi produit infecte efficacement la cellule cible.

(Bas) En absence de Vif, APOBEC3G est empaqueté dans la particule virale. Lorsque le virus entre dans la cellule cible, APOBEC3G introduit des hypermutations dans le génome viral pendant la transcription inverse. Le génome viral non-fonctionnel est soit dégradé, soit intégré. Adaptée de (Simon et al., 2015).

2.2.3 Tetherin/BST2, contrée par Vpu

Le gène codant pour la protéine Tetherin/BST2 a été isolé par une étude de transcriptomique visant à identifier les partenaires de la protéine virale Vpu (Neil et al., 2008). Vpu a été initialement décrite comme une protéine virale qui améliore la libération des virions VIH-1 de la cellule infectée (Strebel et al., 1988). Il n'est donc pas surprenant que l'action de Tetherin/BST2, la protéine cellulaire

contrée par Vpu, consiste à retenir les particules virales à la surface de la cellule infectée et ainsi à empêcher leur dissémination.

Tetherin/BST2 est une protéine intégrale de la membrane de type II qui consiste en une courte région N-terminale cytoplasmique, un domaine trans-membranaire, un domaine coiled-coil extracellulaire attaché à la membrane par une ancre C-terminale glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Kupzig et al., 2003).

Le mécanisme par lequel Tetherin/BST2 retient le virion à la membrane est le suivant (Figure 11) : les dimères de Tetherin/BST2 sont recrutés à la membrane du virion lorsque celui-ci bourgeonne à la membrane plasmique ; l'ancre C-terminale GPI de Tetherin/BST2 est incorporée dans le virion tandis que le domaine trans-membranaire N-terminal retient le tout à la membrane (Damme et al., 2009; Neil et al., 2008; Perez-Caballero et al., 2009; Venkatesh et Bieniasz, 2013). Il semble que les virions retenus par Tetherin/BST2 soient ensuite internalisés et s'accumulent dans les endosomes (Neil et al., 2006; Perez-Caballero et al., 2009).

Plusieurs stratégies non exclusives ont été décrites : 1) Vpu interagit directement avec Tetherin/BST2 pour réduire sa concentration au niveau des sites d'assemblage du virus (McNatt et al., 2013) ; 2) Vpu stimule l'ubiquitination de Tetherin/BST2 dépendante de β -TrCP, qui est suivie de sa dégradation par le lysosome (Mitchell et al., 2009) ; 3) Vpu séquestre Tetherin/BST2 dans la région périnucléaire et entraîne son endocytose et sa dégradation protéasomique (Dubé et al., 2010) ; 4) Vpu détourne la voie de transport qu'utilise classiquement Tetherin/BST2, à savoir la voie dépendante d'AP1 (« clathrin adaptor protein complex 1 ») pour induire un défaut de trafic de Tetherin/BST2 (Jia et al., 2014). En absence de Vpu, l'interaction de Tetherin/BST2 avec AP1 faciliterait l'endocytose des virions retenus à la membrane pour une éventuelle dégradation par le lysosome.

Comme les VIH-2 et certains VIS n'expriment pas Vpu, sa fonction anti-Tetherin/BST2 est assignée à la protéine virale Nef qui interagit avec la queue cytoplasmique N-terminale et induit son endocytose (Jia et al., 2009; Zhang et al., 2009).

La protéine Tetherin/BST2 est aussi considérée comme un senseur de l'infection virale capable d'activer une réponse immunitaire innée (Galão et al., 2012). L'accumulation des virions retenus à la membrane par Tetherin/BST2 induit l'activation de TAK1 suivie de la translocation de NF κ B (« nuclear factor-kappa B ») dans le noyau et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, il est proposé que les virions constituent un PAMP (« pathogen-associated molecular pattern ») et que Tetherin/BST2 agisse comme un PRR (« pathogen recognition receptor »).

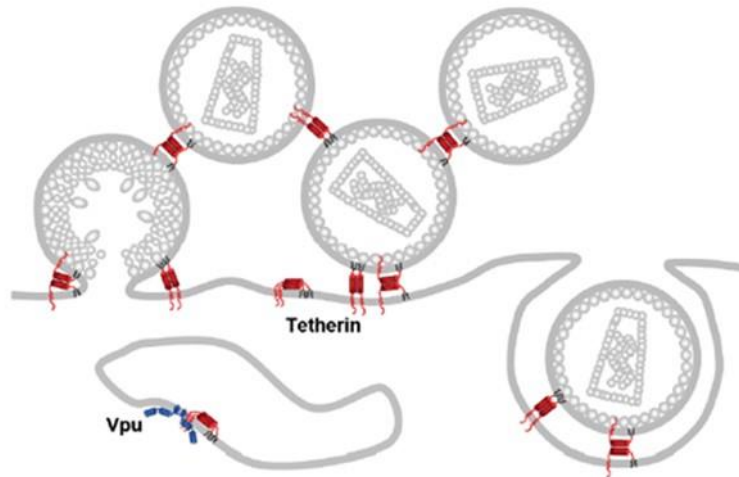
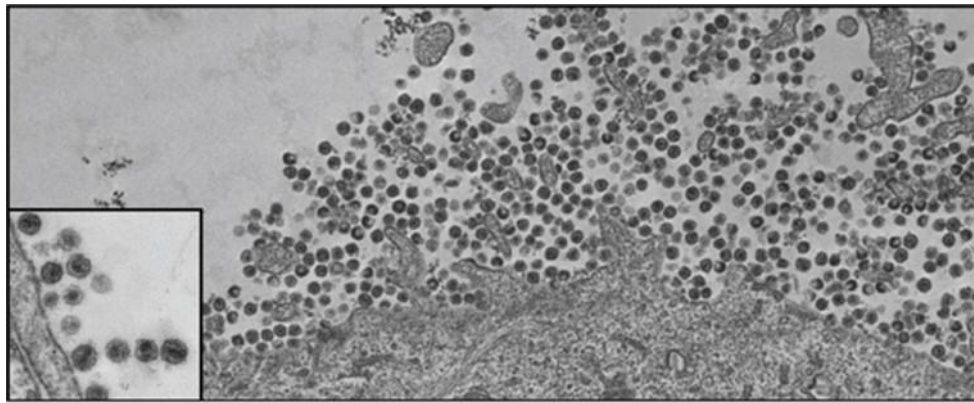


Figure 11. Rétention du VIH à la membrane par Tetherin/BST2.

(Haut) Image de microscopie électronique représentant des virions piégés par Tetherin/BST2 à la surface d'une cellule infectée par le VIH-1 dépourvu de Vpu. **(Bas)** Modèle selon lequel Tetherin/BST2 retient le virion à la surface de la cellule et induit son endocytose. Tirée de (Neil et al., 2008).

2.2.4 SERINC5 et son adversaire viral Nef

Les protéines trans-membranaires de la famille SERINC sont présentes chez tous les eucaryotes, sont hautement conservées et n'ont pas d'homologue connu, suggérant que leurs fonctions au niveau de la membrane sont indispensables (Inuzuka et al., 2005). Ces protéines possèdent entre 10 et 11 domaines trans-membranaires ; elles incorporent des résidus sérine dans la bi-couche lipidique de la membrane et participent ainsi à la synthèse des sphingolipides et de la phosphatidylsérine (Inuzuka et al., 2005). Cependant leur fonction cellulaire exacte est encore mal connue.

La protéine SERINC5 ayant été découverte comme facteur de restriction très récemment (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015), le mécanisme par lequel elle restreint le virus doit encore être approfondi. L'épissage alternatif de SERINC5 donne lieu à cinq isoformes dont la 001 est la

seule à pouvoir inhiber la réplication du VIH-1 et ce grâce à son 10ème domaine trans-membranaire (Zhang et al., 2017). Elle agirait sur la première étape du cycle de réplication en interférant avec la fusion des membranes virale et plasmique (Figure 12) (Usami et al., 2015). Pour ce faire, SERINC5 bloquerait la diffusion des lipides et/ou augmenterait la rigidité des membranes pour diminuer la mobilité des particules virales et interrompre la fusion des enveloppes virale et cellulaire (Sood et al., 2017). Cela entraînerait une exposition prolongée de l'enveloppe virale dans une conformation ouverte et la rendrait plus sensible aux anticorps neutralisants (Tedbury et Sarafianos, 2017).

La protéine virale Nef antagonise SERINC5 (Bentham et al., 2006) en la retirant de la membrane plasmique pour la séquestrer dans des endosomes jusqu'à sa dégradation (Usami et al., 2015). Pour cela Nef utilise la machinerie cellulaire de transport endosomal dépendant de la Clathrine (Pereira et daSilva, 2016).

D'autres déterminants viraux sont capables d'antagoniser SERINC5, l'enveloppe virale en est un (Beitari et al., 2017). Aucune interaction entre l'enveloppe et SERINC5 n'a été montrée pour le moment suggérant que Nef et Env agissent de manière distincte pour contrer SERINC5.

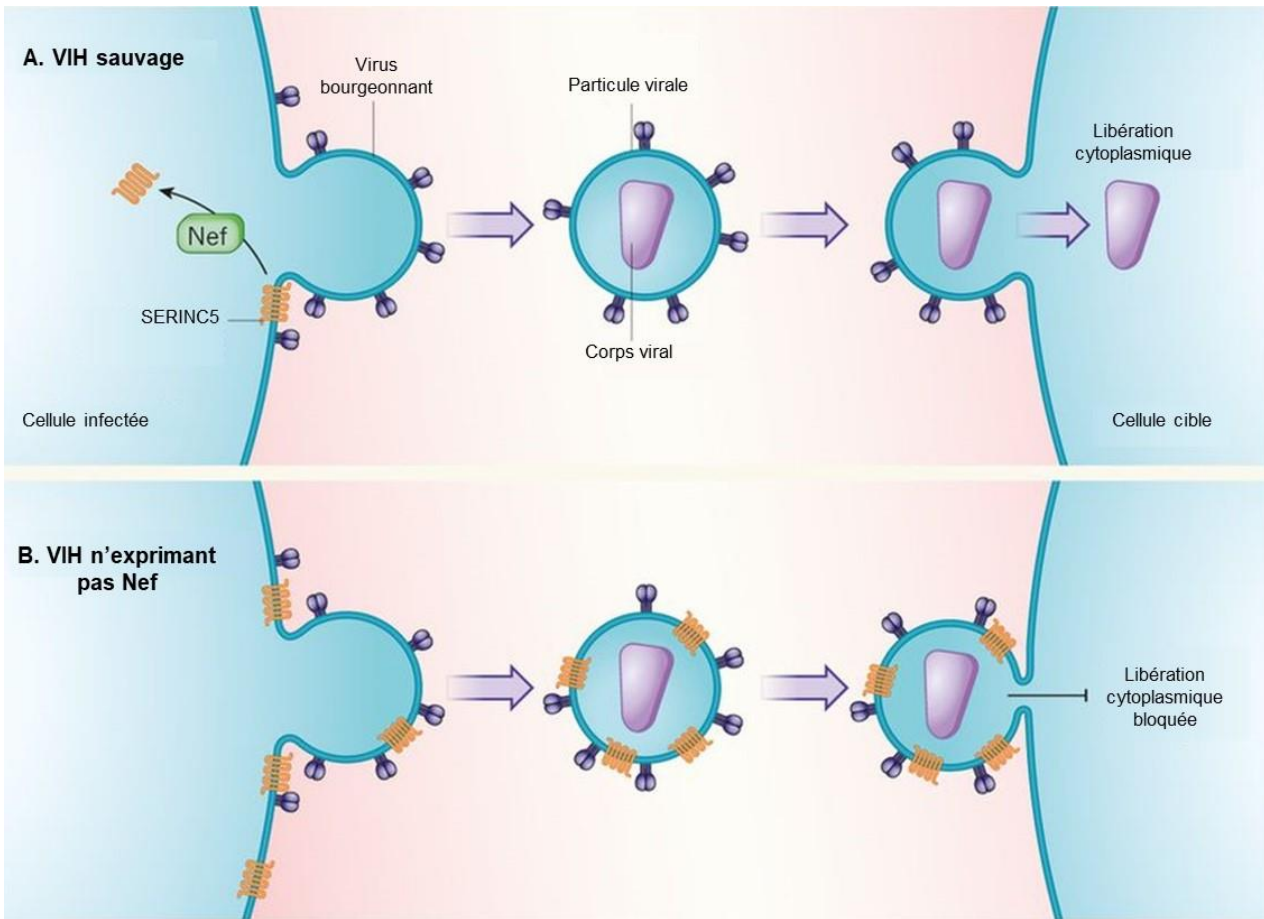


Figure 12. SERINC5 empêche la libération cytoplasmique du corps viral.

(A) Dans le cas d'un VIH sauvage, la protéine virale Nef empêche SERINC5 d'être incorporée à la particule virale. Le virus ainsi libéré peut entrer dans une nouvelle cellule cible et libérer son corps viral. **(B)** En absence de Nef, SERINC5 est incorporée au virion et empêche la libération du matériel viral en inhibant l'étape de fusion. Adaptée de (Aiken, 2015).

2.2.5 La protéine MxB

La protéine Mx2 (« myxovirus resistance protein 2 ») ou MxB est un facteur de restriction du VIH-1 pour lequel aucun antagoniste viral n'est connu (Goujon et al., 2013; Kane et al., 2013; Liu et al., 2013). MxB partage 63% d'homologie de séquence avec MxA qui inhibe les virus de la famille *Orthomyxoviridae* (Zimmermann et al., 2011), bien que l'activité de restriction de ces deux protéines n'engage pas le même mécanisme. MxB possède une activité GTPase qui n'entre pas en jeu dans la restriction du VIH-1 (Fribourgh et al., 2014; Kane et al., 2013). En revanche, l'inhibition de l'infection requiert l'intégrité du signal NLS (« nuclear localization signal »).

MxB interagit avec la structure tridimensionnelle de la capsid virale via sa région N-terminale et son interface de dimérisation, et pourrait donc agir comme un senseur de l'infection (Fribourgh et al., 2014). De manière intéressante, MxB interagit également avec des capsides

mutées qui permettent au virus d'échapper à la restriction. Cette observation suggère que l'interaction de la protéine MxB avec la capsid virale est peut-être nécessaire mais pas suffisante pour expliquer son activité antivirale (Fribourgh et al., 2014). Les données actuelles suggèrent qu'MxB intervient entre les étapes de transcription inverse et d'intégration en interférant avec l'import nucléaire de l'ADN complémentaire viral (Busnadiago et al., 2014; Fribourgh et al., 2014; Goujon et al., 2014; Kane et al., 2013).

3/ SAMHD1, un facteur de restriction actif dans les cellules non-cyclantes

3.1 Identification de SAMHD1 comme facteur de restriction

Avant d'être identifié comme facteur de restriction, SAMHD1 a été trouvé dans le crible d'une librairie d'ADNc provenant de cellules dendritiques humaines (Li et al., 2000). Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigène les plus puissantes (Banchereau et Steinman, 1998 ; Steinman, 1991) capables d'induire une réponse immunitaire innée *in vivo* (Girolomoni et Ricciardi-Castagnoli, 1997). Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents aux caractéristiques uniques de ces cellules, Li et al ont analysé le répertoire des gènes qu'elles expriment. Un crible à large spectre de cette banque a permis d'identifier un nouvel ADNc codant pour une protéine intracellulaire de 626 acides aminés appelée DCIP (« dendritic cell-derived IFN- γ induced protein »). Le gène codant pour DCIP est un homologue humain du gène murin MG11 dont la transcription est induite par l'IFN- γ . Des analogies de séquence ont été trouvées entre DCIP et des protéines de différentes bactéries (Eubactéries, Archaeobactéries) suggérant qu'elles pourraient provenir d'une même grande famille de protéines conservées et reflétant ainsi leur importance pour les fonctions de la cellule, notamment dans la fonction de régulation par l'IFN- γ (Li et al., 2000).

Par la suite, des mutations dans la séquence de DCIP, ont permis de l'associer au Syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS) (Rice et al., 2009). L'AGS est une maladie auto-immune rare dont la transmission est autosomique récessive et dont les manifestations cliniques se rapprochent d'une infection virale congénitale accompagnées d'une forte production d'IFN de type 1.

C'est en 2011 que DCIP a été identifiée comme facteur de restriction du VIH-1 par deux équipes indépendantes (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011) et renommée SAMHD1 après la caractérisation des deux domaines qui la composent : SAM pour « Sterile Alpha Motif » et HD pour « Histidine and Aspartate domain » (Laguette et al., 2011). En effet, il était déjà connu que le VIH-1 se réplique peu efficacement dans les cellules non-cyclantes telles que les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules T CD4+ quiescentes ; et que l'apport de la protéine virale Vpx du VIH-2 augmente la réplication du VIH-1 dans ces cellules. En corrélant ceci avec la capacité de Vpx à augmenter la transcription inverse et à interagir avec un complexe ubiquitine E3 ligase appelé CUL4A/DDB1/DCAF1, ces données ont fortement suggéré l'existence d'un facteur de restriction actif contre le VIH-1 mais inactif contre le VIH-2 car ciblé par Vpx pour une dégradation protéasomique.

Afin d'identifier ce facteur de restriction, Laguette et al ont cherché à identifier les protéines associées à Vp_{X251} du Sooty Mangabey (Laguette et al., 2011). La deuxième équipe à avoir contribué à l'identification de SAMHD1 comme facteur de restriction du VIH-1 s'est quant à elle intéressée aux protéines qui interagissent avec le complexe ubiquitine E3 ligase seulement en présence de Vpx (Hrecka et al., 2011).

Dans les deux études, l'analyse de spectrométrie de masse identifie SAMHD1 comme le partenaire principal de Vpx et le plus abondant (trouvé 6 fois avec Vpx et 37 fois avec le complexe E3-Vpx dans l'étude de Hrecka et al). Par ailleurs les composants du complexe ubiquitine E3 ligase ont été retrouvés dans la spectrométrie de masse de Laguette et al, validant ainsi leur approche expérimentale. Indépendamment de ces deux études, SAMHD1 a été identifiée dans un autre crible visant aussi à identifier de nouveaux partenaires de Vpx (Berger et al., 2011).

Une analyse d'extraits cellulaires de THP1 exprimant Vp_{X251} montre une corrélation entre son expression et les faibles niveaux d'expression de SAMHD1 (Laguette et al., 2011). Ce résultat est retrouvé dans des MDM (« monocyte-derived macrophages ») (Hrecka et al., 2011), des THP1 différenciées et des monocytes primaires (Berger et al., 2011) co-infectés par le VIH-1 et des particules virales exprimant Vpx ; mais aussi par microscopie confocale qui permet d'observer la diminution d'expression de SAMHD1 dans le noyau. Par ailleurs, le traitement de THP1 exprimant Vp_{X251} (Berger et al., 2011; Laguette et al., 2011) ou de MDM (Hrecka et al., 2011) avec du MG132 (un inhibiteur du protéasome) permet de restaurer en partie l'expression de SAMHD1, suggérant fortement que la protéine est dégradée par le protéasome, et ce via le recrutement du complexe CUL4A/DDB1/DCAF1.

L'expression de SAMHD1 dans des cellules permissives au VIH-1 les rend résistantes et inversement, l'inhibition de son expression dans des cellules résistantes les rend permissives. SAMHD1 serait donc un facteur de restriction nécessaire et suffisant.

Le modèle de fonctionnement de SAMHD1 proposé en 2011 est donc le suivant : quand des cellules de la lignée myéloïde comme les cellules dendritiques sont infectées par le VIH-2 ou certains VIS comme celui du Sooty-mangabey (VIS_{smm}), Vpx est libérée dans le cytoplasme, interagit avec SAMHD1 et recrute le complexe Ubiquitin E3 Ligase CUL4A/DDB1/DCAF1 entraînant la dégradation de SAMHD1 par le protéasome. Le virus peut alors se répliquer efficacement (Figure 13A). En revanche dans ces mêmes cellules, SAMHD1 est capable d'inhiber la réplication du VIH-1, qui n'exprime pas Vpx (Figure 13B).

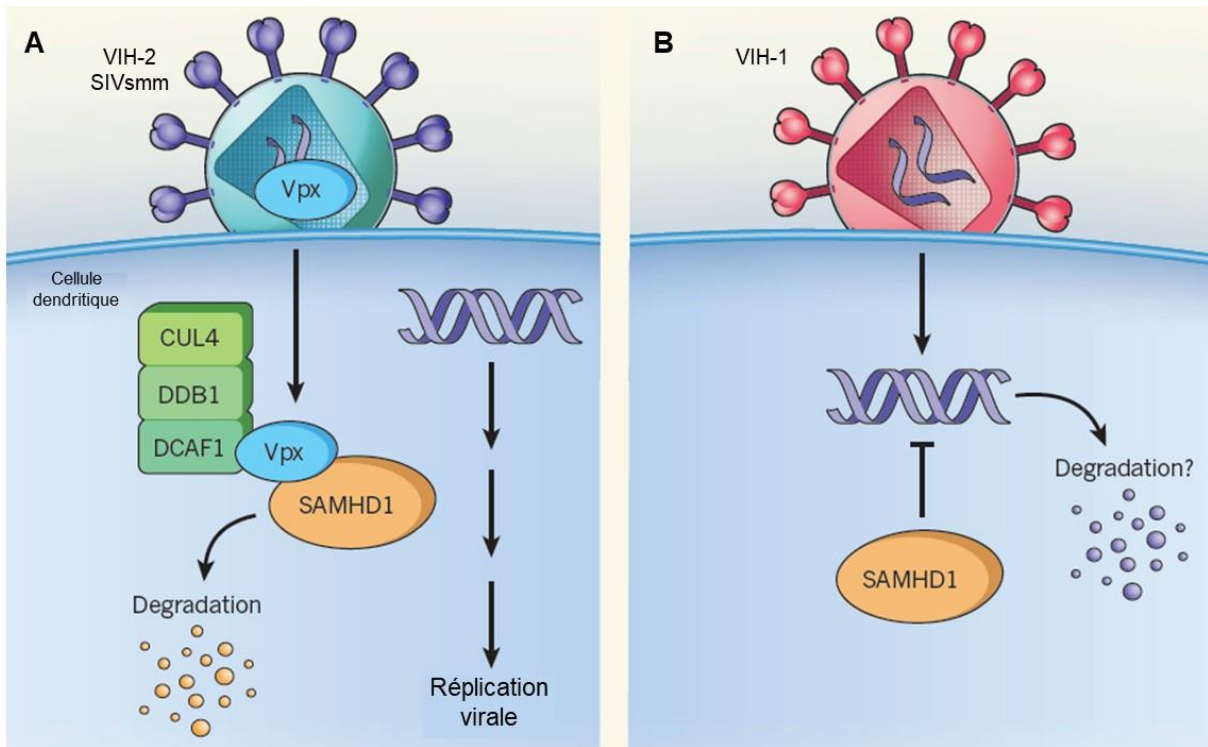


Figure 13. Modèle de restriction par SAMHD1 proposé en 2011.

(A) Lorsque le VIH-2 ou le VISmm infecte une cellule dendritique, la protéine Vpx interagit avec SAMHD1 et recrute le complexe ubiquitine E3 ligase CUL4A-DDB1-DCAF1 qui envoie SAMHD1 à la dégradation protéasomique. Par conséquent, la réplication n'est pas bloquée. **(B)** Lorsque le VIH-1 (qui n'exprime pas Vpx) infecte cette même cellule, sa réplication est bloquée de manière précoce par SAMHD1. Adaptée de (Lim et Emerman, 2011).

3.2 Expression et localisation de SAMHD1

3.2.1 Expression à l'échelle de l'organe

Une étude menée *in vivo* visant à identifier le profil d'expression de SAMHD1 dans les tissus du corps humain a montré, par la technique de « Tissue Micro-Array » (Kampf et al., 2012), que la protéine est exprimée de manière ubiquitaire au sein de l'organisme (Schmidt et al., 2015). Des variations des niveaux d'expression indiquent que SAMHD1 est fortement exprimée dans les cellules de l'intestin, de la rate, de l'œsophage, des ovaires et, à contrario faiblement exprimée dans les cellules de l'utérus, du foie, des muscles et des tissus adipeux.

Sachant que SAMHD1 est capable d'inhiber la réplication du VIH-1, il est intéressant de connaître son profil d'expression dans les tissus d'entrée du virus : SAMHD1 est exprimée de manière abondante et constitutive dans les amygdales (Baldauf et al., 2012), les muqueuses et sous-muqueuses du vagin, du prépuce, de l'anus et du rectum (Schmidt et al., 2015).

3.2.2 Expression à l'échelle de la cellule

Parmi les cellules susceptibles à l'infection par le VIH-1, SAMHD1 est exprimée dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T CD4+ quiescentes ainsi que les cellules T du thymus dans lesquelles l'augmentation de l'expression de SAMHD1 est proportionnelle au degré de maturation de ces cellules (Baldauf et al., 2012; Schmidt et al., 2015). L'expression de SAMHD1 ne se restreint pas aux cellules non-cyclantes puisqu'on la retrouve également dans les cellules T CD4+ activées (Baldauf et al., 2012) suggérant que l'expression de SAMHD1 n'est donc pas influencée par l'état de division cellulaire à la différence de son activité antivirale qui ne se manifeste que dans les cellules qui ne se divisent pas. L'expression de SAMHD1 n'est pas détectée dans certains modèles cellulaires couramment utilisés en laboratoire tels que les cellules Jurkat et les U937 (Franzolin et al., 2013), ceci est sûrement dû à une répression transcriptionnelle au niveau du promoteur du gène dans ces cellules.

3.2.3 Expression à l'échelle intracellulaire

D'un point de vue intracellulaire, Rice et al sont les premiers à déterminer que SAMHD1 s'accumule dans le noyau en étudiant la distribution d'une protéine de fusion entre la GFP (« green fluorescent protein ») et SAMHD1 dans des fibroblastes MRC-5 (Rice et al., 2009). Des études successives ont confirmé que la protéine endogène se concentre dans le noyau des MDM, des THP-1 différenciées, des HeLa (Brandariz-Nuñez et al., 2012) et des lymphocytes T (Baldauf et al., 2012). L'absence de co-localisation avec la Fibrilarin (protéine située exclusivement dans le nucléole), indique que SAMHD1 se trouve précisément dans le nucléoplasme (Brandariz-Nuñez et al., 2012). Toutefois, le fractionnement cellulaire réalisé par Baldauf et al, montre que la répartition de SAMHD1 est équivalente dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules T CD4+ quiescentes, activées et des macrophages (Baldauf et al., 2012).

Le déterminant responsable de l'accumulation nucléaire de SAMHD1 a été identifié en étudiant la distribution sub-cellulaire des protéines de fusion entre la GFP et différentes régions de SAMHD1. Cette analyse a permis d'établir que la région N-terminale de SAMHD1 contient un NLS dont la séquence, ¹¹KRPR¹⁴, est conservée chez l'Homme, le singe rhésus et la souris. La mutation de chaque résidu basique de ce motif en résidu Alanine (¹¹ARPR¹⁴, ¹¹KAPR¹⁴ et ¹¹KRPA¹⁴) conduit à une délocalisation partielle de SAMHD1 au cytoplasme (Brandariz-Nuñez et al., 2012). La fonction du NLS a été confirmée par sa capacité à induire la localisation nucléaire de la protéine virale muNS

du Réovirus aviaire, qui est naturellement strictement cytoplasmique (Brandariz-Nunez et al., 2010; Brandariz-Nuñez et al., 2010).

3.2.4 Trafic intracellulaire de SAMHD1

Le transport intracellulaire des protéines entre le cytoplasme et le noyau dépend de plusieurs voies impliquant notamment l'intervention des karyophérines (Pemberton et al., 1998). Les karyophérines α (ou KPNA) peuvent se lier à une grande diversité de NLS (Kelley et al., 2010) alors que les karyophérines β (ou KPNB) ont une action plus réduite et engagent d'avantage un transport de manière indirecte en recrutant des KPNA (Kosugi et al., 2009).

Le transport nucléaire de SAMHD1 nécessite le recrutement de KPNA2 (Schaller et al., 2014) et de KPNB1 (membre de la famille des karyophérines β) (Guo et al., 2013). L'inhibition de l'expression de KPNB1 entraîne la délocalisation de SAMHD1 dans le cytoplasme (Schaller et al., 2014). SAMHD1 utilise donc une voie classique d'import nucléaire de type KPNA2/KPNB1.

3.2.5 Effet de différentes cytokines sur l'expression de SAMHD1

Comme dit précédemment, SAMHD1 a été initialement identifiée comme un homologue d'une protéine murine inductible par l'IFN- γ (Li et al., 2000). De manière similaire, l'expression de SAMHD1 est augmentée par l'IFN de type I dans les monocytes (Berger et al., 2011; St Gelais et al., 2012). Pourtant, plusieurs études sont en désaccord avec ce résultat et montrent que l'expression de la protéine SAMHD1 n'est pas impactée par l'IFN- α , l'IFN- β ou l'IFN- γ dans des cellules dendritiques, des PBMC (« peripheral blood mononuclear cell »), des MDM, des lymphocytes T CD4+ quiescents et activés (Pauls et al., 2013; Schmidt et al., 2015; St Gelais et al., 2012). Ces discordances peuvent être expliquées par le fait que l'IFN de type I et de type II régule positivement et transitoirement les niveaux d'ARNm de SAMHD1 sans influencer l'expression de la protéine (St Gelais et al., 2012).

Des divergences concernent également l'effet de l'IFN sur l'expression de la forme phosphorylée de SAMHD1 : pour certains elle reste inchangée dans les cellules T CD4+ activées après traitement aux IFN- α et IFN- γ (Schmidt et al., 2015) ; pour d'autres l'IFN- α entraîne une diminution de son expression dans les cellules T CD4+ activées, les MDM, les MDDC et les THP1 (Cribier et al., 2013). Enfin, des désaccords sont à noter concernant l'effet de certaines interleukines

(IL) : Pauls et al montrent que l'IL-12 et l'IL-18 ont pour effet d'augmenter considérablement l'expression de SAMHD1 dans les macrophages (Pauls et al., 2013), alors que Schmidt et al ne retrouvent pas ce résultat, ni dans les PBMC ni dans les MDM.

3.3 Interaction avec et dégradation par la protéine Vpx

3.3.1 Importance de la localisation nucléaire de SAMHD1

Le VIH-2 et certains virus VIS sont insensibles à l'activité antivirale de SAMHD1 car ils expriment la protéine accessoire Vpx qui interagit avec SAMHD1 et recrute le complexe Ubiquitine E3 Ligase Cul4A/DDB1/DCAF1 pour induire sa dégradation par le protéasome (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011).

Une étude datant d'avant la caractérisation de SAMHD1 montre que la localisation nucléaire de Vpx est requise pour une infection efficace des cellules de la lignée myéloïde telles que les monocytes, les macrophages ou encore les THP1 différenciées (Goujon et al., 2008). La localisation intracellulaire de Vpx n'est pas claire puisque selon certains la protéine est nucléaire (Mahalingam et al., 2001 ; Pancio et al., 2000) alors que pour d'autres elle n'est détectée que dans le cytoplasme (Goujon et al., 2008).

De nombreuses divergences dans la littérature persistent également au sujet de la localisation intracellulaire de SAMHD1 requise pour son interaction avec Vpx. On sait que SAMHD1 n'est pas sensible à toutes les protéines Vpx : par exemple la protéine Vpx du VIS_{rcm} ne dégrade pas SAMHD1 alors que celles du VIH-2_{ROD}, du VIS_{mac251} et du VIS_{mac239} la dégrade (Laguette et al., 2011).

Lorsque l'export nucléaire de SAMHD1 est empêché par le traitement de THP1 à la Leptomycine B, un inhibiteur de l'export nucléaire CRM1-dépendant (Kudo et al., 1999), la protéine n'est plus dégradée par Vpx (Laguette et al., 2012) suggérant que SAMHD1 n'est sensible à Vpx que lorsqu'elle sort du noyau.

L'inactivation du NLS de SAMHD1, qui entraîne sa délocalisation au cytoplasme, n'empêche pas son interaction avec Vpx_{mac251} ou Vpx_{HIV-2/ROD} mais la rend résistante à la dégradation (Brandariz-Nuñez et al., 2012; Guo et al., 2013; Hofmann et al., 2012; Schaller et al., 2014). Ce résultat suggère que la dégradation de SAMHD1 requiert sa localisation nucléaire, même si elle peut interagir avec Vpx dans le cytoplasme.

Il est intéressant de noter qu'en présence de SAMHD1, la protéine Vpx_{mac239} se situe à la fois dans le noyau et le cytoplasme, alors qu'elle devient exclusivement cytoplasmique en présence de

SAMHD1 dont le NLS est non fonctionnel (protéine cytoplasmique) suggérant une certaine mobilité de Vpx pour s'adapter à la localisation de SAMHD1 et interagir avec elle (Hofmann et al., 2012).

Ces résultats contradictoires concernant le site de dégradation de SAMHD1 pourraient être la conséquence d'études réalisées dans des contextes expérimentaux différents et/ou de l'utilisation de lignées cellulaires dans lesquelles SAMHD1 est exprimée de façon ectopique (HeLa, 293T, U937). Une sur-expression de la protéine pourrait potentiellement masquer le mécanisme réel et les phénotypes décrits ici ne sont peut-être pas les mêmes que ceux observés dans des cellules myéloïdes primaires.

Un modèle permettant d'expliquer le mécanisme de dégradation de SAMHD1 serait le suivant : SAMHD1 serait ciblée par Vpx dans le noyau puis exportée dans le cytoplasme pour y être dégradée par le protéasome. Cela implique que Vpx ne peut pas induire directement la dégradation de SAMHD1 dans le cytoplasme mais qu'une étape nucléaire est requise. Etant donné que la libération de Vpx dans le cytoplasme ne nécessite pas la décapsidation du génome viral et lui permet d'atteindre rapidement au noyau, ce modèle est tout à fait plausible (Jauregul et al., 2015).

Sachant que le complexe CUL4A/DDB1/DCAF1 est localisé dans le noyau et qu'une majorité de ses substrats sont des protéines aux fonctions nucléaires, cela pourrait expliquer que Vpx ait évolué de manière à utiliser ce complexe dans la voie de dégradation de SAMHD1. Une étape obligatoire dans le noyau serait requise pendant laquelle SAMHD1 serait potentiellement ubiquitinylée pour être ensuite exportée dans le cytoplasme et être dégradée par le protéasome.

En présence de Vpx_{MAC}, l'ubiquitine modifie *in vitro* SAMHD1 par des chaînes poly-K48 et poly-K11 et induit sa dégradation. La protéine SAMHD1 dont le NLS est non fonctionnel (protéine cytoplasmique) est également modifiée par ces chaînes d'ubiquitine mais présente un défaut de dé-ubiquitination qui empêche sa dégradation, suggérant l'importance de la localisation nucléaire pour l'interaction avec le complexe Ubiquitine E3 ligase (Schaller et al., 2014).

Dans le cas d'une infection par le VIH-1 (donc en absence de Vpx), que la protéine SAMHD1 soit nucléaire ou cytoplasmique (NLS non fonctionnel) n'influence pas la résistance des cellules au virus, suggérant que l'activité antivirale n'est pas modifiée en fonction de la localisation de SAMHD1 (Brandariz-Nuñez et al., 2012; Schaller et al., 2014).

3.3.2 Déterminants structuraux de SAMHD1 impliqués dans la dégradation par Vpx

La dégradation de SAMHD1 induite par Vpx joue un rôle primordial dans la capacité des VIH-2 et VIS à échapper aux défenses antivirales des cellules non-cyclantes de la lignée myéloïde (Baldauf et al., 2012; Berger et al., 2011; Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011; Lahouassa et al., 2012). Quels sont les déterminants mis en jeu entre ces deux partenaires protéiques ?

La structure cristallographique du complexe ternaire Vpx_{smm} + DCAF1 (région C-ter) + SAMHD1 (région C-ter) obtenue par Schwefel et al permet de mieux comprendre sa conformation (Figure 14) (Schwefel et al., 2014). Vpx_{smm} et SAMHD1 sont situés sur les faces opposées de DCAF1.

L'interface d'interaction entre SAMHD1 et Vpx est grande. Les résidus L610, V618, L620 et F621 de SAMHD1 sont regroupés dans une poche hydrophobe située entre deux hélices de la partie C-terminale de Vpx_{smm}. Cette interface contient aussi des interactions électrostatiques entre les résidus E15 et E16 de Vpx_{smm} et le motif tribasique R609, R617 et K622 de SAMHD1. Ce motif tri-basique est conservé chez les primates mais absent chez les espèces qui ne sont pas des hôtes des VIH/VIS. Les résidus E15 et E16 de Vpx sont également conservés chez toutes les protéines Vpx qui induisent la dégradation de SAMHD1. Cela suggère que la complémentarité de ces motifs est à l'origine de la spécificité d'interaction entre Vpx et SAMHD1 (Laguette et al., 2012; Schwefel et al., 2014).

Au contraire, l'interface d'interaction entre SAMHD1 et DCAF1 est petite. La seule interaction directe se fait entre les résidus K622 de SAMHD1 et D1092 de DCAF1. Le résidu D1092 de DCAF1 est également en interaction avec le résidu Y66 de Vpx_{smm} (Schwefel et al., 2014).

Enfin, l'interface d'interaction entre DCAF1 et Vpx est bien plus grande et forme un sillon pour accueillir SAMHD1. Cette interface met en jeu trois liaisons entre les deux protéines. Vpx enroulent trois structures en hélice autour de la région C-ter de DCAF1 (Schwefel et al., 2014).

Muter les résidus impliqués dans ces interfaces d'interaction a pour effet de réduire le taux d'infection, d'inhiber l'interaction entre Vpx et DCAF1 ou d'empêcher la dégradation protéasomique de SAMHD1 (Srivastava et al., 2008 ; Wei et al., 2012 ; Bergamaschi et al., 2009).

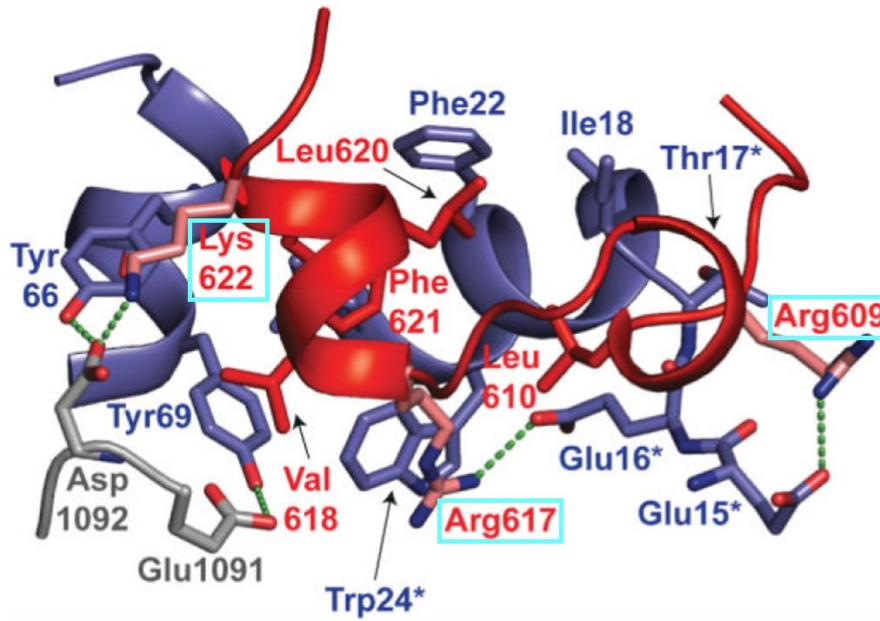


Figure 14. Interface d'interaction SAMHD1/Vpx/DCAF1.

Structure tridimensionnelle de l'interface d'interaction entre la région C-terminale de SAMHD1 (en rouge), de Vpx_{Smm} (en bleu), et de la région C-terminale de DCAF1 (en gris). Les résidus du motif tribasique sont entourés en cyan ; les pointillés verts représentent les liens hydrogènes entre les trois molécules ; les résidus importants pour la fonction de Vpx sont notés d'un astérisque. Tirée de (Schwefel et al., 2014).

Afin de déterminer si la région C-terminale de SAMHD1 suffit pour l'interaction avec Vpx et si le motif tri-basique (R609, R617 et K622) est important, une nouvelle approche expérimentale *in vivo* a été mise en oeuvre : une construction appelée « degron » consiste en la fusion de la région C-ter de SAMHD1 d'une protéine NLS-GFP. Les cellules 293T transduites avec le degron émettent un signal GFP dans le noyau, confirmant l'approche expérimentale. L'apport de Vpx diminue considérablement le signal GFP alors qu'il est possible de le récupérer à l'ajout de MG132 ou bien par l'infection avec un virus VIS n'exprimant pas Vpx. Ces résultats indiquent que la perte du signal GFP vient de la dégradation du degron par le protéasome qui est initiée par Vpx (Schwefel et al., 2014). Inversement, la protéine SAMHD1 Δ C-ter n'est pas dégradée par Vpx_{mac251} (Laguette et al., 2012).

Une co-immunoprécipitation montre que Vpx_{mac251} n'interagit pas avec les mutants de SAMHD1 Δ 575-626 et Δ 595-626 indiquant que l'interaction entre SAMHD1 et Vpx_{mac251} a lieu au niveau des 30 derniers acides aminés de SAMHD1 (Laguette et al., 2012). Muter les résidus du motif tribasique (en alanine ou acide glutamique) a pour effet de réduire considérablement la capacité de Vpx à induire la dégradation du degron. Pour autant, ces mutations n'empêchent pas le degron d'avoir une activité de restriction contre le VIH-1 suggérant que le motif tribasique de SAMHD1 n'est pas important pour son activité antivirale (Schwefel et al., 2014).

3.3.3 Une spécificité inter-espèces détermine l'interaction entre les protéines SAMHD1 et Vpx

La conservation du motif tri-basique de SAMHD1 et du motif di-glutamate de Vpx suggère une spécificité d'espèce entre ces deux protéines (Figure 15). En plus d'être sensible aux protéines Vpx_{ROD}, Vpx_{mac251} Vpx_{mac239}, la protéine SAMHD1 humaine est dégradée par Vpx_{smm} et Vpx_{dr11} (du singe Drill) (Laguet et al., 2012). A contrario, SAMHD1 n'est pas dégradée par Vpx_{rcm}, et Vpx_{mnd2} (du Mandrill). Cela peut être expliqué par le fait que chez les protéines Vpx_{rcm} et Vpx_{mnd2}, le motif PPGNSGE^{15E16T} n'est pas conservé.

Pour mieux comprendre cette spécificité inter-espèces, Schwefel et al ont utilisé de nouveau l'approche expérimentale décrite précédemment en construisant un degon entre la protéine NLS-GFP et la région N-terminale de SAMHD1_{mnd2}. L'apport de la protéine Vpx_{mnd2} dans les cellules qui expriment le degon induit la dégradation de ce dernier alors que la protéine Vpx_{smm} n'a aucun effet (Schwefel et al., 2015). Cela suggère deux choses : 1) la protéine Vpx_{mnd2} est spécifique de la protéine SAMHD1_{mnd2} et 2) la dégradation est induite après une interaction de Vpx avec la région N-terminale de SAMHD1 (Figure 15) (Fregoso et al., 2013; Schwefel et al., 2015). De plus, le NLS et le domaine SAM de SAMHD1 sont requis pour la dégradation de SAMHD1_{mnd2} par Vpx_{mnd2}.

Il existe deux régions variables dans la séquence de Vpx, VR1 et VR2, qui diffèrent en fonction du virus. La région VR2 est constituée d'un motif di-tyrosine : Y62/Y65 chez le virus du mandrill et Y66/Y69 chez le virus du sooty-mangabey. Lorsque ces résidus sont mutés en alanine, on observe une perte de dégradation de SAMHD1. Ces régions de Vpx constituent, tout comme les régions de SAMHD1, des déterminants majeurs de la spécificité d'interaction entre SAMHD1 et Vpx.

Les régions N-terminale et C-terminale de SAMHD1 ne sont pas les seules importantes puisque Kang et al montrent que le domaine HD possède aussi des déterminants impliqués dans sa dégradation (Kang et al., 2016). Ce domaine est donc à l'origine de beaucoup de propriétés de SAMHD1 : il est important pour l'activité dNTPase (Goldstone et al., 2011), pour l'activité nucléase (Ryoo et al., 2014) et pour l'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 (Hu et al., 2015; Zhao et al., 2013). Considérant l'importance de ce domaine, il n'est pas surprenant qu'il soit ciblé par Vpx pour dégrader SAMHD1.

Vpx du VIS_{mac} est capable d'induire la dégradation de la protéine SAMHD1 humaine (SAMHD1_{hu}) mais pas de SAMHD1 du poulet (SAMHD1_{gg}) (Kang et al., 2016). L'alignement des séquences des deux protéines montre que la partie C-terminale, importante pour l'interaction avec Vpx_{mac} (Schwefel et al., 2014) présente une très faible similarité.

Remplacer un à un chaque domaine de SAMHD1hu par le domaine correspondant de SAMHD1gg permet de déterminer que le domaine HD abolit quasiment complètement la dégradation de SAMHD1 induite par Vpx_{mac}.

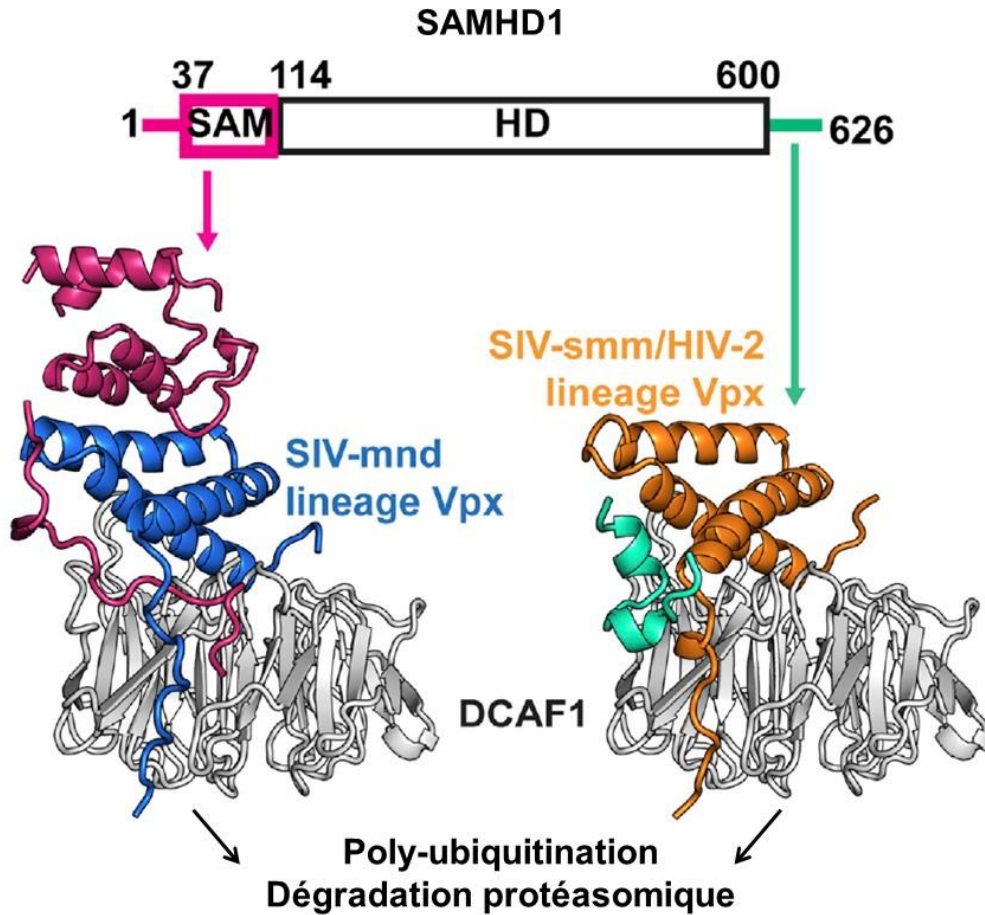


Figure 15. Reconnaissance spécifique de SAMHD1 par Vpx selon l'espèce.

La protéine Vpx provenant du Mandrill (VIS_{mnd2}) (en bleu) reconnaît la région N-terminale de SAMHD1 (en rose) alors que Vpx provenant du Sooty-mangabey (VIS_{smm}) ou du VIH-2 (en orange) se fixe à la région C-terminale de SAMHD1 (en vert). Tirée de (Schwefel et al., 2015).

3.4 Organisation structurale de SAMHD1

3.4.1 Architecture de SAMHD1

3.4.1.1 Domaine SAM

Positionné en région N-terminale, le domaine SAM pour « Sterile Alpha Motif » est impliqué dans les interactions entre protéines et contribue à la fixation de SAMHD1 aux acides nucléiques (Figure 16) (Beloglazova et al., 2013). Il a été caractérisé à partir de 14 protéines eucaryotes dans lesquelles une région d'environ 70 acides aminés est conservée (Ponting, 1995 ; Schultz et al, 1997). Le nom SAM vient du fait que 4 des 14 protéines identifiées sont impliquées dans la différenciation sexuelle de la levure (« Sterile ») et la prédiction de leur structure secondaire indique de nombreuses hélices alpha (« Alpha motif »).

Les domaines SAM présentent diverses fonctions : ils peuvent interagir entre eux, permettre la fixation à d'autres protéines comme les kinases ou les enzymes de conjugaison des protéines SUMO ou encore se fixer aux acides nucléiques (Qiao et Bowie, 2005).

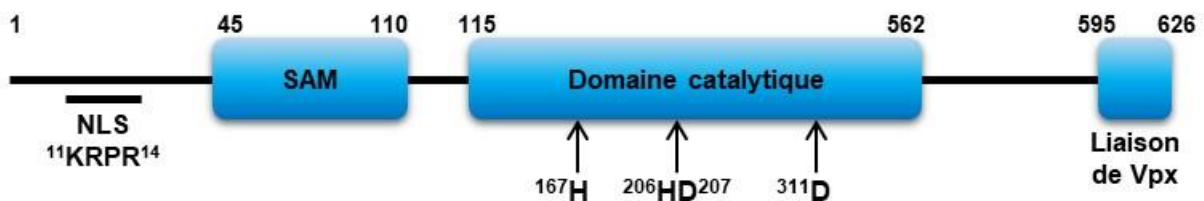


Figure 16. Schéma représentant les domaines de SAMHD1.

La région N-terminale contient le NLS (résidus 11-14) et le domaine SAM (résidus 45-110). Le domaine catalytique (résidus 115-562) est riche en résidus Histidine et Aspartate comme indiqué. La région C-terminale contient le motif de liaison à Vpx (résidus 595-626).

3.4.1.2 Domaine Histidine et Aspartate

Élément central de la protéine, le domaine HD pour « Histidine and Aspartate domain » est retrouvé dans diverses familles de phosphohydrolases chez les Bactéries, les Archaea et les Eucaryotes (Aravind et al., 1998). Il contient les sites enzymatiques de SAMHD1 et il est indispensable pour son activité dNTPase et son activité nucléase (Figure 16) (White et al., 2013a).

La fonction principale conférée aux protéines par le domaine HD est une activité phosphohydrolase (Francis et al., 1994; Huber et al., 1988; Johnson et al., 1979), mais il semblerait

que ces protéines soient aussi impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et la transduction du signal.

3.4.1.3 NLS et région C-terminale

SAMHD1 contient un NLS qui lui confère une localisation majoritairement nucléaire. Les détails concernant sa caractérisation sont abordés dans la partie 3.2 de l'introduction. La région C-terminale de SAMHD1 contient le site d'interaction avec la protéine Vpx des VIH-2 et certains VIS. Les déterminants de cette région de SAMHD1 impliqués dans l'interaction avec la protéine virale sont décrits dans la partie 3.3 de l'introduction.

3.4.2 Structure de SAMHD1

La structure cristallographique du coeur catalytique de SAMHD1 (acides aminés 120 à 626) obtenue par Goldstone et al, indique que la protéine est composée de 19 hélices alpha et 9 feuillets bêta (Figure 17). Ces repliements peuvent être séparés en deux domaines : un domaine principal (acides aminés 120 à 451) composé d'un lobe majeur et d'un lobe mineur et un domaine secondaire qui correspond à la région C-terminale de SAMHD1 (acides aminés 455 à 583) (Goldstone et al., 2011).

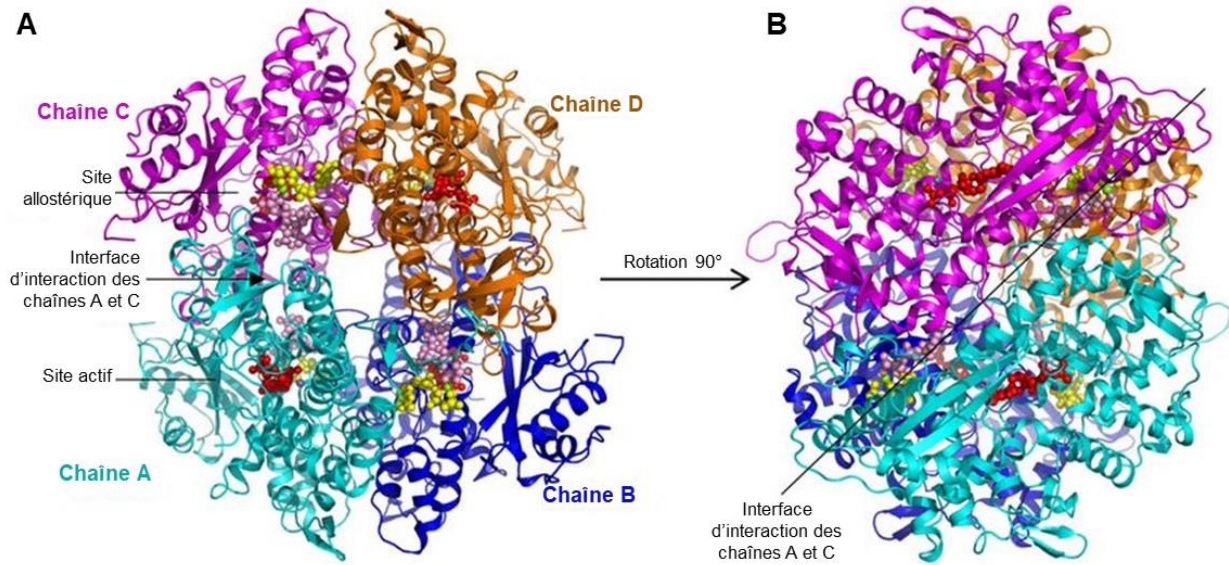


Figure 17. Architecture du tétramère de SAMHD1.

(A) Représentation en ruban du tétramère composé des quatre monomères de SAMHD1 : chaînes A (cyan), B (bleu), C (rose) et D (orange). Au niveau du site actif sont indiqués un substrat (rouge) et un ion Zn²⁺ (gris). Au niveau du site allostérique sont indiqués deux molécules activatrices de dGTP (jaune et rose pâle) et un ion Mg²⁺ (vert). (B) Rotation de 90° de la structure sur le plan vertical. PDB ID : 3U1N. Adaptée de (Zhu et al., 2013).

SAMHD1 possède une interface de dimérisation et est majoritairement sous forme de dimère en solution. La structure de Goldstone et al indique qu'un ion phosphate associé à un ion zinc sont proches du motif HD de SAMHD1 et permettent de localiser le site actif de l'enzyme entre le lobe majeur et le lobe mineur jusqu'à la région C-terminale. Tout autour de ce site, les résidus de SAMHD1 forment un réseau d'interactions avec les ions phosphate et zinc (Goldstone et al., 2011). Comparer la structure de SAMHD1 avec celle de la protéine 2HEK (protéine bactérienne qui possède également un domaine HD) a permis à Goldstone et al de localiser les site allostériques.

De manière intéressante, une interface de dimérisation très similaire est présente dans la structure du domaine HD d'*Enterococcus faecalis*, une protéine bactérienne active sous forme de tétramère (Vorontsov et al., 2011) (voir paragraphe sur la dégradation des dNTP plus bas). A partir de là, la tétramérisation de SAMHD1 a été étudiée et confirmée (Brandariz-Nuñez et al., 2013a).

Une sous-unité de SAMHD1 possède deux sites allostériques : l'allo-site 1 et l'allo-site 2 ; ainsi qu'un site catalytique.

Les deux sites allostériques sont proches et connectés par un ion Mg²⁺ qui lie leur groupe phosphate. Seuls le GTP et le dGTP peuvent se fixer à l'allo-site 1 grâce à un réseau spécifique de cinq liens hydrogène au niveau des résidus suivant de SAMHD1 : D137, Q142 et R145. La seule

différence conformationnelle entre la liaison du GTP et celle du dGTP est le déplacement de quelques résidus de SAMHD1 qui permet la formation d'un sixième lien hydrogène pour accueillir le dGTP. Cette différence dénote une affinité légèrement plus grande pour le GTP puisqu'elle ne demande pas de modification (Goldstone et al., 2011). En effet, il faut une concentration en dGTP quatre fois plus grande pour qu'il se fixe sur l'allo-site 1 à la place du GTP. Or dans les conditions physiologiques d'une cellule, il y a mille fois plus de GTP, suggérant que ce dernier occupe l'allo-site 1 de manière exclusive (Ji et al., 2014).

L'allo-site 2 quant à lui ne peut pas accueillir le GTP à cause de l'incompatibilité entre son groupe 2'-OH et le cycle aromatique du résidu de SAMHD1 F157. Ceci explique pourquoi le GTP seul en solution ne suffit pas à induire la tétramérisation de SAMHD1. L'allo-site 2 peut fixer les quatre dNTP avec une configuration quasi similaire, grâce à un réseau flexible de quatre résidus de SAMHD1 : N119, D330, N358 et R372. Néanmoins, c'est après la fixation du dATP sur l'allo-site 2 que le tétramère de SAMHD1 est le plus stable. De manière générale, on constate un ordre d'affinité de liaison des dNTP sur l'allo-site 2 : dATP > dGTP > dTTP > dCTP.

Tout comme l'allo-site 2, le site catalytique peut accueillir les quatre dNTP. De manière intéressante, il semble que l'ordre d'affinité de liaison des dNTP sur ce site soit l'inverse de celui sur l'allo-site 2 : dCTP > dGTP/dTTP > dATP.

3.4.3 Rôle de l'oligomérisation dans les activités cellulaires et de restriction

Afin de connaître l'importance de l'oligomérisation de SAMHD1 pour son activité de restriction, les résidus responsables de la tétramérisation ont été identifiés et ont permis de générer des mutants. L'interface entre deux monomères est stabilisée par deux points d'attache hydrophobes contenant les résidus Y146, Y154, L428 et Y432 (Brandariz-Nuñez et al., 2013a). Le mutant de SAMHD1 Y146S/Y154S perd sa capacité à oligomériser et son activité dNTPase est indétectable comparée à celle de la protéine sauvage, suggérant que l'oligomérisation de SAMHD1 est requise pour son activité dNTPase. De manière surprenante, ce même mutant maintient une activité de restriction du VIH-1 dans des cellules différenciées indiquant que l'oligomérisation n'est pas nécessaire au bon fonctionnement de son activité antivirale.

Cependant, Yan et al proposent que la tétramérisation joue un rôle dans les fonctions de SAMHD1 et que le domaine catalytique ne soit pas le seul impliqué dans l'inhibition de l'infection. Des régions situées en dehors de ce domaine régulent positivement ou négativement l'activité antivirale de SAMHD1 dans les cellules non-cyclantes (Yan et al., 2013).

Lorsque la protéine SAMHD1 est tronquée de la région C-terminale (mutant $\Delta 595-626$), l'inhibition du virus est levée et le taux d'infection par le VIH-1 est 100 fois plus fort que dans les cellules qui expriment la protéine sauvage. De plus ce mutant possède une activité dNTPase très faible et ne peut pas former de tétramère stable. Cela suggère que la partie C-terminale de SAMHD1 joue un rôle important dans son activité antivirale et son activité catalytique mais aussi qu'elle est importante pour la formation et la stabilité du tétramère.

A contrario, une mutation dans la région C-terminale de SAMHD1, LF620AA, lui confère une meilleure activité de restriction. De manière intéressante ce mutant possède une activité dNTPase accentuée puisqu'on observe une augmentation d'hydrolyse des dNTP de 50% par rapport à la protéine sauvage.

Pris tous ensemble ces résultats nous permettent de proposer le modèle suivant pour expliquer le processus de tétramérisation et d'activation de SAMHD1 (Figure 18) : en absence de GTP/dGTP, SAMHD1 est présente sous forme de monomère/dimère à l'équilibre, et est incapable de former un tétramère. Lorsque le GTP (ou le dGTP) se fixe à l'allo-site 1 de chaque monomère, l'équilibre est modifié et les groupes triphosphate de chaque molécule de GTP sont solidarisés par des forces électrostatiques afin de stabiliser les dimères.

C'est lorsque les dNTP se fixent ensuite sur l'allo-site 2 que la tétramérisation est induite. Le tétramère est maintenu par les interactions entre les dimères, impliquant la base et le groupe triphosphate du dNTP positionné sur l'allo-site 2. La fixation d'un dNTP sur l'allo-site 2 est couplée thermodynamiquement à la fixation d'un dNTP sur le site catalytique. A ce moment-là, l'équilibre dimère/tétramère est modifié et il n'y a plus que des tétramères de SAMHD1. L'activation de l'enzyme ne demande pas de réapprovisionnement en molécule activatrice (GTP/dGTP), cela permet d'assurer la stabilité de SAMHD1 durablement sous forme tétramérique et active (Hansen et al., 2014).

Concernant l'importance de la tétramérisation dans les fonctions de SAMHD1, nous savons que le domaine catalytique est impliqué dans la structure quaternaire de la protéine ainsi que dans son activité dNTPase. La région N-terminale contenant le NLS et le domaine SAM est impliquée dans la localisation de la protéine. Le fait que cette région soit conservée suggère l'importance de la localisation dans les fonctions cellulaires de la protéine. La partie C-terminale quant à elle, permet d'induire un tétramère stable de SAMHD1 avec une activité dNTPase fonctionnelle (Yan et al., 2013).

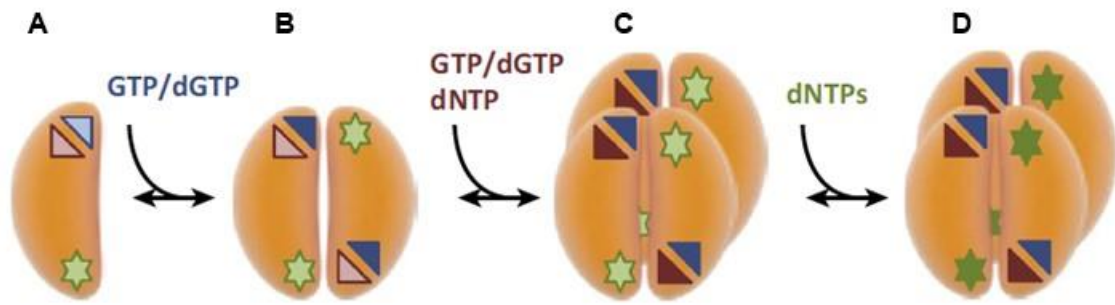


Figure 18. Mécanisme d'oligomérisation et d'activation de SAMHD1.

(A) Chaque monomère de SAMHD1 possède deux sites allostériques (triangles) et un site catalytique (étoile). **(B)** La fixation du GTP/dGTP sur l'allo-site 1 (triangle bleu rempli) induit la dimérisation. **(C)** Le tétramère se forme après fixation d'un dNTP sur l'allo-site 2 (triangle rouge rempli). **(D)** Un dNTP se fixe ensuite sur le site catalytique. Adaptée de (Ballana et Esté, 2015).

3.5 Activités cellulaires de SAMHD1

Rapidement après son identification comme facteur de restriction du VIH-1 dans les cellules non-cyclantes, Goldstone et al ont testé deux fonctions cellulaires potentielles de SAMHD1 : l'activité dNTPase et l'activité nucléase (Goldstone et al., 2011). L'hypothèse d'une activité nucléase vient du fait que des mutations de SAMHD1 sont impliquées dans l'AGS et que les protéines impliquées dans cette maladie possèdent une activité nucléase (Lindahl et al., 2009; Qiu et al., 1999). L'hypothèse d'une activité dNTPase vient quant à elle du fait que SAMHD1 possède un domaine HD, qui a déjà été décrit comme à l'origine d'une telle activité.

3.5.1 Dégradation des dNTP

Dans les cellules de mammifères, le maintien d'une quantité équilibrée de dNTP est crucial pour la bonne progression du cycle cellulaire, l'intégrité génomique, l'activation du système immunitaire et la restriction virale (Gon et al., 2011; Kumar et al., 2011; Rampazzo et al., 2010). Cette concentration en dNTP est rigoureusement régulée par un mécanisme mettant en jeu la Ribonucléotide réductase ou RNR pour la synthèse et SAMHD1 pour l'hydrolyse.

La RNR synthétise les dNTP en convertissant les ribonucléotides diphosphate (NDP) en désoxyribonucléotides diphosphate (dNDP) en fonction de la phase du cycle cellulaire (Nordlund et Reichard, 2006). La RNR est régulée afin de synthétiser de façon homogène les quatre dNDP.

C'est en se basant sur deux caractéristiques qu'il a été suggéré que la protéine SAMHD1 est impliquée dans la régulation des dNTP. Premièrement, bien qu'elle soit faible, SAMHD1 partage une homologie de séquence avec la protéine EF1143 d'*Enterococcus faecalis*, une protéine bactérienne impliquée dans le métabolisme des nucléotides (Vorontsov et al., 2011). Tout comme SAMHD1, EF1143 possède un domaine HD à l'origine de son activité catalytique dNTPase.

Deuxièmement, dans les MDM au dernier stade de différenciation la concentration en dNTP est 200 fois plus basse que dans des cellules T CD4+ activées (Diamond et al., 2004). Bien que les Lentivirus se soient adaptés et peuvent se répliquer dans des conditions où les niveaux de dNTP sont faibles, la transcription inverse du VIH-1 dans les MDM est bien plus faible que dans les cellules T CD4+ activées. Il est pourtant possible d'augmenter l'efficacité de la transcription inverse du VIH-1 en ajoutant des dNTP au milieu de culture, suggérant donc que la quantité de dNTP est un facteur limitant à l'infection par le VIH-1 dans les MDM.

L'équipe de Florence Margottin-Goguet a alors émis l'hypothèse que SAMHD1 régule les niveaux intracellulaires de dNTP et influence la transcription inverse du VIH-1 (Lahouassa et al., 2012). Cette hypothèse est soutenue par Bonifati et al qui montrent que les taux de dNTP sont plus faibles dans des THP1 où SAMHD1 est sur-exprimée (Bonifati et al., 2016).

Pour valider cette hypothèse, Lahouassa et al ont mesuré la concentration en dNTP dans des THP1 différenciées dans lesquelles l'expression de SAMHD1 est inhibée. Les taux de dNTP dans ces cellules sont plus élevés que dans les THP1 sauvages. On retrouve ce résultat après traitement des cellules avec des particules virales qui expriment Vpx (dégradation de SAMHD1) (Lahouassa et al., 2012), ou dans un système CRISPR/Cas9 (inhibition de l'expression de SAMHD1) (Badia et al., 2017; Bonifati et al., 2016). Ceci confirme que SAMHD1 agit sur les niveaux de dNTP.

Goldstone et al déterminent que SAMHD1 est plus précisément une désoxyguanosine triphosphate triphosphohydrolase car sur les quatre nucléotides triphosphate testés indépendamment, elle ne peut hydrolyser que le dGTP (Goldstone et al., 2011). L'analyse approfondie du produit d'hydrolyse montre que SAMHD1 convertit le dGTP en guanosine et trois phosphates inorganiques, une fonction enzymatique inhabituelle qui, en 2011 lors de cette découverte, n'avait jamais été décrite chez les eucaryotes et l'avait été seulement partiellement chez la bactérie.

Etant donné que SAMHD1 ne peut hydrolyser les trois autres dNTP qu'en présence du dGTP, il est proposé que le dGTP soit le substrat activateur de l'enzyme. La capacité de SAMHD1 à hydrolyser les dNTP a ensuite été confirmée *in vitro* et *in vivo* dans les MDM (Lahouassa et al., 2012).

La localisation de SAMHD1 n'influence pas son activité dNTPase. En effet lorsque le NLS de SAMHD1 est muté et que la protéine devient cytoplasmique, elle maintient une activité enzymatique comparable à la protéine sauvage (Hofmann et al., 2012) suggérant fortement qu'elle hydrolyse les dNTP dans le cytoplasme.

La caractérisation des fonctions de SAMHD1 et de la RNR a pu mettre en évidence des similarités dans leurs propriétés enzymatiques (Ji et al., 2013) :

- elles sont toutes deux actives après une oligomérisation
- elles possèdent deux types de sites allostériques qui détectent et régulent la concentration en dNTP via un troisième site dit catalytique
- leur activité est régulée très précisément par la fixation des nucléotides sur les sites allostériques
- leur site allostérique 1 accueille un nucléotide spécifique alors que le site allostérique 2 peut accueillir les quatre dNTP

Les deux enzymes divergent aussi à plusieurs niveaux :

- la RNR est activée sous forme d'hétéro-tétramère lorsqu'une molécule d'ATP se fixe sur l'allo-site 1 alors que SAMHD1 est activée sous forme d'homo-tétramère après fixation du GTP ou du dGTP sur l'allo-site 1
- chez la RNR, l'ATP sur l'allo-site 1 et les dNTP sur l'allo-site 2 contrôlent l'activité du site catalytique par rapport au substrat ribonucléotide diphosphate alors que SAMHD1 utilise les dNTP à la fois comme activateurs allostériques et substrats

Au final, le dATP est le dernier dNTP à être synthétiser par la RNR. De manière simultanée, les fortes concentrations en dATP ont pour effet d'interrompre l'activité de la RNR et d'enclencher celle de SAMHD1. SAMHD1 et la RNR auraient évolué de façon à utiliser les taux de dATP comme interrupteur ON/OFF pour leur activité respective.

3.5.2 Dégradation des acides nucléiques

L'AGS est causée par des mutations dans la séquence protéique de l'exonucléase TREX1 (« Three-prime repair exonuclease 1 ») et de l'endonucléase RNaseH2 qui se traduisent par un dysfonctionnement de ces protéines et l'accumulation d'acides nucléiques endogènes, ce qui *in fine* enclenche une réponse immune innée et une production massive d'IFN de type I (voir paragraphe sur l'AGS plus bas).

Sachant que des mutations dans la séquence de SAMHD1 peuvent également causer la maladie, il a été suggéré que SAMHD1 pourrait posséder une activité nucléase comme TREX1 et RNaseH2 ou du moins une capacité à lier les acides nucléiques. De plus, le domaine SAM de la protéine a été décrit comme un domaine de liaison aux ARN pour les protéines Smaug de la drosophile et Vts1p de la levure (Aviv et al., 2003; Oberstrass et al., 2006). Il y a donc plusieurs raisons de penser que SAMHD1 partage ces propriétés.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, Goncalves et al. ont identifié les partenaires protéiques de différents acides nucléiques (Goncalves et al., 2012) : l'ISD (« Interferon Stimulatory DNA ») qui stimule l'expression de l'interferon β , le CT-DNA (« calf thymus DNA ») ou encore le Poly(I:C) (« Polyinosinic: polycytidylic acid ») un ARN synthétique semblable à l'ARN de certains virus, qui interagit avec un récepteur présent à la surface des cellules dendritiques et des macrophages pour susciter une réponse immunitaire semblable à celle déclenchée lors d'une infection virale. Il se trouve que SAMHD1 a été identifiée dans cette analyse de spectrométrie de masse. Goncalves et al montrent que SAMHD1 est non seulement capable d'interagir avec les acides nucléiques mais qu'elle lie plus rapidement l'ARN que l'ADN. Mais, contrairement à TREX1, SAMHD1 ne démontre aucune activité d'hydrolyse des ADN et des ARN testés.

Cependant, Beloglazova et al exposent le contraire. Selon eux, SAMHD1 possède la capacité de dégrader les ADNs_{sb} et les ARNs_{sb} (sb pour simple brin) en présence de Mg²⁺, Mn²⁺ et Ca²⁺. De plus, SAMHD1 semblerait avoir une plus grande affinité de liaison pour les acides nucléiques comprenant des structures secondaires complexes comme une tige-boucle (Beloglazova et al., 2013), c'est le cas par exemple des ARN et ADN du VIH-1. Enfin, Ryoo et al démontrent que SAMHD1 est une RNase car elle digère uniquement les ARNs_{sb} *in vitro*, mais ne digère pas les autres acides nucléiques (ADNs_{sb}, ARNs_{db}, ADNs_{db} etc) (Ryoo et al., 2014). Ce résultat rejoint en partie ceux de Beloglazova malgré des divergences qui peuvent être expliquées par des différences dans les conditions expérimentales utilisées (procédure de purification des protéines par exemple).

Selon Goncalves et al, la région de SAMHD1 impliquée dans l'interaction avec les acides nucléiques superposerait une partie du domaine HD. Cette interaction n'est pas empêchée après la délétion du domaine SAM, remettant en question le caractère indispensable de ce domaine

(Beloglazova et al., 2013; Goncalves et al., 2012). Enfin, la mutation du site catalytique inhibe les deux activités cellulaires de SAMHD1 (dNTPase et nucléase) (Ryoo et al., 2014) ; et l'activité nucléase est inhibée quand on ajoute des dNTP exogènes au milieu (Beloglazova et al., 2013). Pris ensemble ces résultats suggèrent que les deux activités cellulaires de la protéine partagent un site actif commun.

Le mutant de SAMHD1 Q548A ne peut plus se lier à l'ARN et ne peut pas restreindre le VIH-1, mais maintient son activité dNTPase. Ce résultat suggère un lien entre l'activité de liaison à l'ARN et l'activité antivirale de SAMHD1.

Afin d'expliquer ces résultats, il est proposé que SAMHD1 soit une enzyme bi-fonctionnelle pour laquelle la prédominance d'une des deux activités dépend des niveaux de dGTP dans la cellule. Quand les niveaux de dGTP sont bas, SAMHD1 est un monomère ou un dimère possédant une activité de liaison aux acides nucléiques et/ou une activité RNase qui restreint l'infection par le VIH-1. Dans ce cas, et si l'activité RNase est avérée, SAMHD1 dégrade l'ARN viral. En présence de grandes quantités de dGTP, SAMHD1 forme un tétramère et possède alors une activité dNTPase qui restreint l'infection par le VIH-1 en diminuant les niveaux de dNTP. Enfin, une autre possibilité est que l'activité dNTPase ralentisse la transcription inverse de façon à laisser le temps à l'activité RNase de dégrader les ARN viraux dans les cellules différenciées. Tout cela reste malgré tout très controversé dans la littérature et ne permet pas de conclure précisément à un mécanisme de restriction rétrovirale.

3.6 Modification post-traductionnelles de SAMHD1

Contrairement aux autres facteurs de restriction dont l'expression seule suffit à bloquer l'infection par le VIH-1, l'activité antivirale de SAMHD1 semble être soumise à divers mécanismes de régulation puisque la protéine est exprimée dans des cellules où aucune restriction du virus n'est détectée. On sait, par exemple que SAMHD1 est exprimée à des niveaux similaires dans les cellules T CD4+ quiescentes et activées, pourtant les cellules T CD4+ activées sont permissives à l'infection. Ceci suggère la présence d'un co-facteur ou de modifications post-traductionnelles qui sont impliqués dans la régulation de l'activité antivirale de SAMHD1.

3.6.1 La phosphorylation

3.6.1.1 *SAMHD1 est phosphorylée principalement sur le résidu T592 par le complexe cycline/kinase CyclinA2/CDK1-CDK2*

L'état de division de la cellule semble donc être important pour la restriction du virus. Des U937 non cyclantes exprimant de manière stable SAMHD1 sont huit fois moins permissives au VIH-1 que des U937 cyclantes (Cribier et al., 2013).

Pour identifier de potentiels partenaires de SAMHD1 impliqués dans la régulation de son activité antivirale, des analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées à partir de THP1 différenciées ou non (Cribier et al., 2013; White et al., 2013b; Yan et al., 2015), de U937 exprimant SAMHD1 et différenciées ou non (White et al., 2013b), de MDM (White et al., 2013b), de cellules HeLa (Welbourn et al., 2013) et de 293T (St. Gelais et al., 2014). Le complexe CyclinA2/CDK1 a été identifié comme le partenaire principal de SAMHD1 dans les cellules en division. Il s'agit d'un régulateur du cycle cellulaire exprimé uniquement pendant les phases S et G2/M. La kinase CDK2 a également été identifiée ultérieurement (St. Gelais et al., 2014; Yan et al., 2015).

St Gelais et al procèdent à cette analyse également à partir de la protéine SAMHD1 murine. Cette dernière interagit avec la CyclinB1 contrairement à la forme humaine de SAMHD1, suggérant ainsi que, selon l'espèce animale, les fonctions de SAMHD1 sont régulées par des protéines cellulaires différentes et spécifiques de l'hôte.

L'inhibition de l'expression de la CyclinA2 et des kinases CDK1 et CDK2 résulte en la perte ou la diminution de la phosphorylation de SAMHD1, confirmant l'implication de ce complexe dans la modification post-traductionnelle de la protéine.

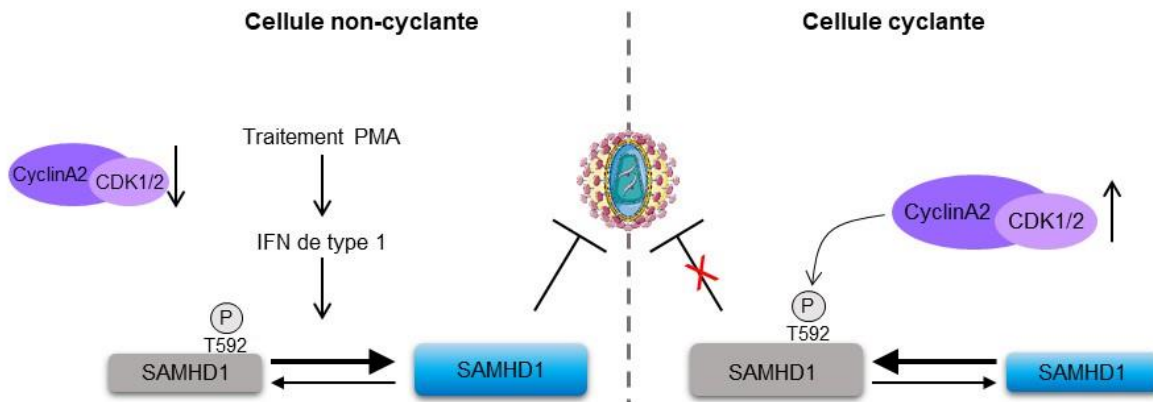


Figure 19. Modèle de la régulation de SAMHD1 par la phosphorylation sur le résidu T592.

Dans les cellules qui ne se divisent pas (gauche), par exemple des U937 ou THP1 traitées à la PMA (phorbol 12-myrystate 13-acetate), la forme non phosphorylée de SAMHD1 est prédominante et est capable de restreindre la réplication virale. Dans les cellules en division (droite), le complexe CyclinA/CDK1-2 induit la phosphorylation de SAMHD1 sur le résidu T592, la rendant inapte à la restriction. Inspirée de (Cribier et al., 2013).

Le complexe CyclinA2/CDK1-2 n'est exprimé que dans les cellules en division (en phases S et G2/M) et explique le fait que SAMHD1 ne soit pas phosphorylée dans les monocytes primaires, les cellules T CD4+ quiescentes, les U937 et les THP1 différenciées (St. Gelais et al., 2014; White et al., 2013b; Yan et al., 2015). On peut également corréler la phosphorylation de SAMHD1 à sa perte d'activité antivirale dans les cellules en division (Figure 19).

De manière générale, les complexes Cyclin/CDK se fixent à leur substrat via une séquence bipartite composée du site accepteur de phosphate et du motif de fixation de la cycline, en aval. Chez SAMHD1, les résidus ciblés par la CyclinA2 sont les résidus L620 et F621 (Yan et al., 2015). Une analyse par spectrométrie de masse dans des cellules HeLa permet d'identifier les résidus accepteurs de phosphate de SAMHD1 : S6, T21, S33 et T592 (Welbourn et al., 2013). Par ailleurs, un alignement de la séquence de SAMHD1 de diverses espèces montre que le résidu T592 est conservé et se trouve dans le site consensus pour la CDK1-2 : ⁵⁹²TPQK⁵⁹⁵ (Cribier et al., 2013; Yan et al., 2015). Ce site est défini comme le site majeur de phosphorylation après que sa mutation ou l'inhibition de la CDK1 résulte en une réduction massive voire une abolition de la phosphorylation de SAMHD1.

Les niveaux de dNTP dans la cellule respectent un équilibre entre leur synthèse par la RNR et leur dégradation par SAMHD1. Il est donc attendu que l'activité de SAMHD1 soit régulée négativement durant la phase S, phase durant laquelle il y a réplication du matériel génétique et les niveaux de dNTP sont les plus forts. Comme le complexe cyclinA2/CDK s'active à la transition G1/S et est responsable de l'initiation de la synthèse nucléaire d'ADN, il est fort probable que la phosphorylation de SAMHD1 par ce complexe soit à l'origine de l'inhibition de SAMHD1 durant la phase S.

3.6.1.2 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur son oligomérisation

L'étude de la régulation d'une protéine nécessite la création de mutants qui miment ou inhibent ce mécanisme. Pour SAMHD1, ont été générés des mutants 1) qui miment la phosphorylation et sont dits phospho-mimétiques : T592D et T592E ; 2) qui ne peuvent pas être phosphorylés et sont dits phospho-ablatifs : T592A et T592V.

Une expérience de co-immunoprécipitation montre qu'aucun des mutants phospho-mimétiques et phospho-ablatifs ne présente de défaut d'oligomérisation (White et al., 2013b). L'état d'oligomérisation de SAMHD1 peut aussi être suivi en fonction de la vitesse de sédimentation de la protéine en présence de nucléotides activateur et substrat. Le mutant phospho-mimétique T592D forme un tétramère mais qui n'est pas stable dans le temps (Bhattacharya et al., 2016; Yan et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation n'empêche pas la tétramérisation de la protéine mais impacte fortement sa stabilité.

Par ailleurs, des études de cristallographie indiquent que le mutant phospho-ablatif T592V possède la même structure que la protéine sauvage (Tang et al., 2015) alors que le mutant phospho-mimétique T592E, qui forme un tétramère dont la structure est très proche de celle de la protéine sauvage, a pour différence le déplacement d'une hélice α qui résulte en la rotation d'un dimère par rapport à l'autre (Arnold et al., 2015; Tang et al., 2015). Cette rotation a pour effet d'ouvrir la structure, rendant le site allostérique beaucoup plus accessible mais déstabilisant la fixation du nucléotide. Ces changements de conformation ont pour conséquence finale de réduire considérablement la stabilité du tétramère de SAMHD1 (Arnold et al., 2015; Tang et al., 2015).

Une autre approche expérimentale pour suivre la formation et la dissociation du tétramère de SAMHD1 en fonction de son état de phosphorylation est l'utilisation d'une molécule de GTP fluorescente. La fixation du GTP sur l'allo-site 1 se traduit par l'augmentation de fluorescence alors que la dissociation du tétramère se traduit par la diminution de la fluorescence (Bhattacharya et al., 2016). Après incubation du GTP avec le mutant phospho-mimétique T592D, la diminution de

fluorescence survient beaucoup plus rapidement qu'avec la protéine sauvage, signifiant que le tétramère est moins stable.

3.6.1.3 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur ses activités cellulaires

Il est important de déterminer l'effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur son activité dNTPase pour mieux comprendre le mécanisme de restriction rétrovirale, mais les données sur cet aspect de la régulation de SAMHD1 divergent grandement.

La mesure de l'activité dNTPase *in vitro* de SAMHD1 montre que les mutants phospho-mimétiques T592E et T592D hydrolysent les dNTP moins efficacement que la protéine sauvage (cinétique d'hydrolyse du dATP 3 fois moins forte) (Tang et al., 2015; Yan et al., 2015). Ce résultat est cohérent avec la perte d'activité antivirale de ces mutants. L'expression des mutants SAMHD1 LF620AA et 1-617, qui ne peuvent plus interagir avec la CyclinA2, entraîne une perturbation de la synthèse d'ADN en phase S suggérant qu'ils maintiennent une activité dNTPase en absence de phosphorylation. La phosphorylation semble donc réguler négativement l'activité dNTPase de SAMHD1 en phase S.

Pourtant ces résultats ne sont pas partagés par d'autres équipes qui montrent que la phosphorylation ne régule pas l'activité dNTPase. En effet, la concentration en dNTP dans des U937 différenciées ou des HeLa (Bhattacharya et al., 2016; Welbourn et al., 2013; White et al., 2013b) reste inchangée, que les cellules expriment SAMHD1 sauvage, les mutants phospho-mimétiques ou phospho-ablatifs. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation régule négativement l'activité antivirale sans impacter l'activité dNTPase et permet donc de découpler ces deux activités, considérées jusqu'ici comme une même et seule entité (Figure 20).

Afin de se placer dans des conditions proches de celles des cellules de la lignée myéloïde qui ont de faibles concentrations en dNTP, Arnold et al mettent en place une approche expérimentale dans laquelle ils incubent SAMHD1 phosphorylée ou non avec du GTP (nucléotide activateur) et du dATP (nucléotide substrat) (Arnold et al., 2015). Lorsque la totalité du dATP est hydrolysée, ils ajoutent au milieu du ddGTP qui peut seulement être hydrolysé mais ne peut pas induire la formation du tétramère. La protéine SAMHD1 non phosphorylée est capable d'hydrolyser le ddGTP signifiant que la structure de la protéine est telle qu'elle peut garder le GTP dans le site allostérique et qu'elle forme un tétramère stable. A contrario, la protéine SAMHD1 phosphorylée n'hydrolyse pas le ddGTP suggérant que le GTP n'est pas resté dans le site allostérique et que le tétramère s'est dissocié rapidement après l'hydrolyse du dATP (comme expliqué dans le paragraphe précédent).

En outre, une divergence majeure persiste : selon Cribier et al, un mutant de SAMHD1 ne possédant plus la région C-terminale (comprenant le site de phosphorylation) peut restreindre l'infection par le VIH-1 (Cribier et al., 2013). Alors qu'Arnold et al démontrent que la suppression de cette région a pour effet de déstabiliser le tétramère et engendre un mutant incapable de restreindre l'infection (Arnold et al., 2015). Arnold et al proposent que la capacité de SAMHD1 à former un tétramère stable lui permette de retenir les dNTP dans les sites allostériques et de maintenir une activité dNTPase fonctionnelle quand la concentration en dNTP est très basse comme dans les cellules différenciées. En revanche dans les cellules qui se divisent, la concentration en dNTP est forte, SAMHD1 est phosphorylée et bien qu'elle puisse hydrolyser les dNTP, la structure du tétramère étant ouverte au niveau d'un site allostérique, les nucléotides activateurs sont rapidement perdus, l'enzyme se dissocie et s'inactive pour finalement ne pas impacter la concentration en dNTP.

Une certaine quantité de données déjà publiées soutiennent et renforcent l'hypothèse que l'activité antivirale de SAMHD1 est supportée par son activité dNTPase. Cette dernière a été intensivement étudiée autant au niveau structural que biochimique chez d'autres protéines contenant un domaine HD et en plus, il a été démontré à plusieurs reprises que des mutations dans le site actif du domaine HD de SAMHD1 lui font perdre son activité antivirale. Malgré tout, les résultats présentés ici divergent et laissent envisager que la régulation de l'activité antivirale ne peut pas être expliquée aussi simplement.

Ces discordances peuvent être expliquées par le fait que la tétramérisation n'est pas le seul déterminant du bon fonctionnement de l'activité dNTPase de SAMHD1. De manière comparable, l'activité de synthèse des dNTP de la RNR est soumise à des régulations multiples dont la multimérisation n'est qu'un aspect (Nordlund et Reichard, 2006). La régulation de SAMHD1 pourrait impliquée d'autres modifications post-traductionnelles, l'interaction avec un ou plusieurs co-facteurs cellulaires ou viraux ou encore la liaison aux acides nucléiques.

Par ailleurs, les mutants de SAMHD1, phospho-mimétiques et phospho-ablatifs, sont capables de fixer l'ARNdb comme la protéine sauvage (White et al., 2013b) suggérant que la phosphorylation n'a pas d'impact sur cette propriété de SAMHD1. Cependant, cet aspect non plus ne met pas toute la communauté scientifique d'accord puisque selon Ryoo et al, les niveaux d'ARN viraux sont stabilisés dans les cellules qui expriment le mutant phospho-mimétique T592D (Ryoo et al., 2014). Ces divergences suggèrent que la phosphorylation de SAMHD1 pourrait soit promouvoir soit interférer avec le recrutement de facteurs cellulaires qui régulent négativement son activité nucléase.

3.6.1.4 Effet de la phosphorylation de SAMHD1 sur son activité antivirale

Il semblerait que l'expression du mutant phospho-ablatif T592A rende les U937 cyclantes résistantes à l'infection (Cribier et al., 2013) alors que l'expression du mutant phospho-mimétique T592D/E rendrait les U937 différenciées permissives à l'infection (Arnold et al., 2015; Bhattacharya et al., 2016; Welbourn et al., 2013; White et al., 2013b). Lorsque l'on inhibe l'expression de CDK1 et CDK2, les cellules sont moins permissives à l'infection par le VIH-1 (St. Gelais et al., 2014). A partir de ces résultats, il est donc proposé que la phosphorylation régule négativement l'activité antivirale de SAMHD1 et ce uniquement dans les cellules en division.

Cependant, le résultat de Cribier et al n'étant pas reproductible, il suscite des divergences. En effet, l'expression des mutants phospho-ablatifs T592A/V dans des 293T (St. Gelais et al., 2014), dans des U937 (Arnold et al., 2015) ou des HeLa (White et al., 2013b) ne résulte pas en l'inhibition du VIH-1, suggérant qu'abolir la phosphorylation de SAMHD1 ne suffit pas à rendre les cellules cyclantes résistantes à l'infection.

Il est intéressant de noter que tous les mutants de SAMHD1 (phospho-mimétiques comme phospho-ablatifs) restent sensibles à la dégradation menée par Vpx (Cribier et al., 2013; Welbourn et al., 2013; White et al., 2013b) suggérant que cette voie de dégradation est indépendante de l'état de phosphorylation de SAMHD1.

Une étude récente indique que la phosphorylation de SAMHD1 dans les lymphocytes primaires T CD4+ est induite et augmentée par l'interleukine 7 (IL-7) et résulte en l'inhibition de son activité anti-VIH-1 et par conséquent promeut une transcription inverse et une intégration provirale efficaces (Coiras et al., 2016). Sachant que les cytokines comme l'IL-7 activent souvent des voies impliquant des tyrosine kinases, le traitement des lymphocytes T CD4+ avec le Dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinases qui inhibe la réplication du VIH-1 entraîne une perte de la phosphorylation de SAMHD1 et un défaut de transcription inverse et d'intégration et permet de confirmer le rôle de l'IL-7.

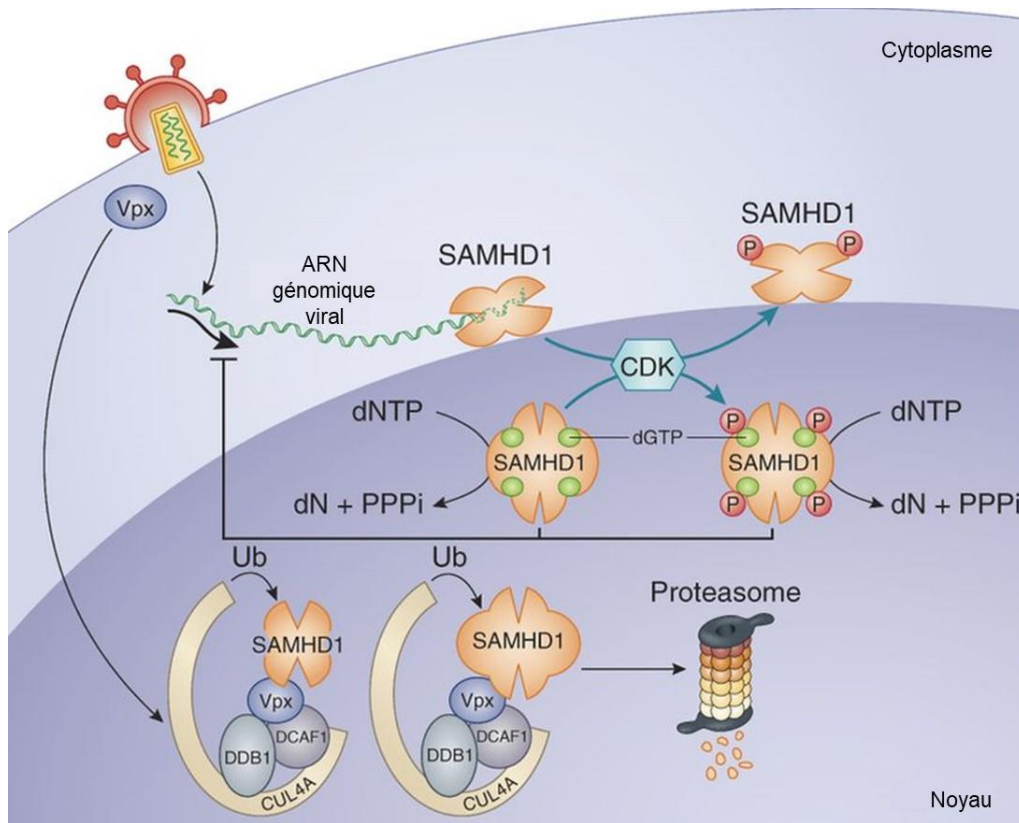


Figure 20. Modèle de restriction par SAMHD1 proposé en 2015.

Les VIH-2, VIS ou VIH-1 modifié exprimant la protéine Vpx entre dans une cellule myéloïde. Vpx transite jusqu'au noyau et se fixe au complexe ubiquitine E3 ligase CUL4A-DDB1-DCAF1 et à SAMHD1 qui est dégradée ensuite par le protéasome. En absence de Vpx, SAMHD1 réduit les niveaux de dNTP et bloque la réplication à l'étape de transcription inverse. Une alternative (controversée) serait que SAMHD1 dégrade l'ARN viral génomique dans le cytoplasme. L'activité antivirale de SAMHD1 est régulée par la phosphorylation sur le résidu T592. Tirée de (Simon et al., 2015).

3.6.1.5 La phosphorylation de SAMHD1 chez la souris

Chez la souris, l'épissage alternatif du dernier exon de SAMHD1 (l'exon 16) résulte en l'expression de deux isoformes, ISF1 et ISF2, qui diffèrent au niveau des 30 derniers acides aminés de la région C-terminale. Le rôle de SAMHD1 chez la souris n'est pas clair, Behrendt et al montrent que les cellules myéloïdes de souris dans lesquelles l'expression de SAMHD1 est inhibée deviennent sensibles à l'infection par le VIH-1 mais ne semblent pas être plus sensibles à l'infection par les rétrovirus murins (Behrendt et al., 2013; Bloch et al., 2017).

Le résidu T634 d'ISF1 (absent chez ISF2) est l'homologue du résidu humain T592, et se trouve dans le motif consensus de phosphorylation $\underline{T}PXK$ (Bloch et al., 2017). Les protéines ISF1, ISF2, le mutant phospho-ablatif ISF1 T634A et le mutant de délétion ISF1 Δ Cter inhibent l'infection par le VIH-1 alors que le mutant phospho-mimétique ISF1 T634E n'en est pas capable. De manière

comparable à SAMHD1 dans les cellules humaines, ces résultats suggèrent que la phosphorylation des isoformes murines régule leur activité antivirale.

ISF2 possèdent une activité dNTPase plus forte qu'ISF1 (la concentration en dNTP est plus faible dans les cellules qui expriment ISF2). Tout comme SAMHD1 humaine, ISF1 est sous forme dimérique en absence de dGTP et forme un tétramère lorsque la concentration en dGTP augmente. Les mutants ISF1 phospho-ablatif T634A, de délétion ISF1 Δ Cter et phospho-mimétique T634E maintiennent leur activité dNTPase. A contrario, ISF2 est présente sous forme tétramérique active en présence ou en absence de dGTP suggérant qu'elle est une isoforme hautement active de SAMHD1 dont la tétramérisation et l'activité dNTPase sont indépendantes du dGTP. Une hypothèse serait qu'ISF2 recycle en continu les dNTP afin d'en assurer la qualité, ou empêche la synthèse d'ADN cytoplasmiques dérivés de rétrovirus endogènes ou de rétroéléments.

Ni les isoformes murines sauvages ni les mutants ne sont capables de dégrader l'ARN *in vitro*. Enfin, aucune des deux isoformes murines n'est sensible à la dégradation menée par Vpx, sûrement à cause de leur séquence C-terminale qui diffère de l'isoforme humaine et ne permet pas la liaison de Vpx.

3.6.2 Répression transcriptionnelle par la méthylation

Nous savons que SAMHD1 est très exprimée dans les lignées monocytaires (THP1 par exemple) alors qu'elle est indétectable dans les lignées T CD4 (telles que les Jurkat et les Sup-T1). L'absence d'expression de SAMHD1 dans ces lignées provient d'une régulation négative au niveau transcriptionnel. En effet, les niveaux d'ARNm de SAMHD1 sont 1100 fois plus bas dans les Jurkat et les Sup-T1 que dans les THP1 (de Silva et al., 2013).

DeSilva et al montrent qu'il ne s'agit pas d'un défaut d'activité du promoteur puisqu'ils détectent un niveau basal de transcription du gène, et suggèrent que la régulation de son promoteur est sûrement épigénétique. En effet, la caractérisation du promoteur de SAMHD1 montre la présence d'un îlot CpG proche du codon d'initiation et ciblé par la méthylation dans les THP1 mais pas dans les Jurkat et les Sup-T1. On peut également corréler le fait que les lymphocytes primaires T CD4 expriment de forts niveaux d'ARNm de SAMHD1 avec le fait que le promoteur du gène ne soit pas méthylé dans ce type cellulaire (de Silva et al., 2013). Une potentielle implication clinique de cette régulation de SAMHD1 concerne le cancer du poumon. En effet, dans les tissus de patients atteints de ce cancer, le promoteur est méthylé et l'expression de SAMHD1 est réduite d'un facteur 30 comparé aux tissus sains (Wang et al., 2014).

3.6.3 Acétylation

Une analyse de spectrométrie de masse visant à identifier les partenaires protéiques de l'acétyltransférase ARD1 a permis de déterminer que SAMHD1 est acétylée autant *in vitro* qu'*in vivo* (Lee et al., 2017). La construction de mutants de délétion de SAMHD1, un test d'acétylation *in vitro* et une analyse de spectrométrie de masse ont permis d'identifier le résidu K405 comme le site d'acétylation de SAMHD1. L'alignement de la séquence de SAMHD1 provenant de différentes espèces montre que ce résidu est conservé (de l'humain jusqu'au xénope) suggérant l'importance de cette modification dans les fonctions biologiques de SAMHD1. L'acétylation de SAMHD1 régulerait positivement son activité dNTPase puisque les niveaux de dTTP sont beaucoup plus faibles dans des cellules qui expriment la forme acétylée (comparé à la forme non modifiée). De plus, les tissus provenant de patients atteints d'hépatocarcinome expriment davantage SAMHD1 et l'acétyltransférase ARD1 que les tissus sains. L'acétylation de SAMHD1 semble stimuler la prolifération des cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent que l'acétylation de SAMHD1 a un rôle dans la régulation des mécanismes de cancérogenèse.

3.7 SAMHD1 et le rétro-élément LINE-1

3.7.1 Divergences quant à la restriction de LINE-1 par SAMHD1

LINE-1 (L1) est le seul rétro-élément autonome et actif chez l'Homme. Il peut s'insérer dans le génome grâce à ses activités endonucléase et de rétrotranscription (Feng et al., 1996; Mathias et al., 1991) et représente ainsi 17% du génome humain (Beck et al., 2011).

Il est possible de mesurer l'activité de rétrotransposition du rétro-élément grâce à un système expérimental établi dans les cellules 293T. Il s'agit d'une construction contenant une cassette rapportrice EGFP qui est 1) positionnée dans l'orientation transcriptionnelle opposée à LINE-1, 2) insérée dans la région 3' UTR et 3) interrompue par un intron. Lorsque le transcrit L1 est épissé et rétrotranscrit, son ADN complémentaire est inséré dans le génome de l'hôte et le gène rapporteur EGFP est exprimé (Zhao et al., 2013). Via cette méthode, on sait que la rétrotransposition de LINE-1 est réduite voire inhibée en présence de SAMHD1 de manière dose-dépendante (Herrmann et al., 2018; Zhao et al., 2013). Il existe d'autres systèmes expérimentaux permettant de mesurer cette activité :

- Le premier consiste en une modification de la construction présentée plus haut, utilisée dans des cellules HeLa : la cassette EGFP est remplacée par un marqueur de résistance à la néomycine. Cette résistance n'est acquise que si LINE-1 rétrotranspose, ce qui n'est pas le cas en présence de SAMHD1 (Hu et al., 2015; Zhao et al., 2013)

- Le second, utilisable à la fois dans des HeLa et des 293T, correspond à l'inhibition directe de l'expression de SAMHD1 par un siARN ou bien sa dégradation par l'apport de la protéine Vpx, et qui ont pour effet d'augmenter considérablement la rétrotransposition de LINE-1 (Hu et al., 2015; Zhao et al., 2013)

3.7.2 Les activités cellulaires et de restriction de SAMHD1 interviennent elles dans l'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 ?

Des divergences concernant le fonctionnement de l'activité anti-LINE-1 de SAMHD1 persistent dans la littérature (Herrmann et al., 2018; Zhao et al., 2013).

SAMHD1 est incapable de restreindre le VIH-1 dans les HEK 293T et pourtant elle inhibe la rétrotransposition de LINE-1 dans ces cellules. De plus, le mutant SAMHD1 D311A qui n'a plus d'activité dNTPase, est également capable d'inhiber L1. Ces résultats suggèrent que le mode d'inhibition du rétro-élément ne dépend pas de l'activité dNTPase et diffère du mécanisme de restriction.

A contrario, deux autres équipes montrent que les mutants de SAMHD1 de perte d'activité dNTPase D207N, H233A, D311A et H206A/D207A ne sont pas capables d'inhiber la rétrotransposition de LINE-1, suggérant que l'activité enzymatique est requise (Herrmann et al., 2018; Hu et al., 2015).

Le mutant SAMHD1 Q548A, qui n'a plus d'activité RNase est toujours capable de restreindre LINE-1 tout comme le mutant L248S/Y432S qui ne peut plus oligomériser (Herrmann et al., 2018).

Les mutants SAMHD1 Δ 162-335 et Δ 113-136 qui perdent partiellement le domaine HD ainsi que le mutant de la région linker entre les domaines SAM et HD, ont une plus faible activité contre LINE-1 que la protéine sauvage alors que la suppression du domaine SAM Δ 42-109 renforce l'inhibition du rétro-élément (Zhao et al., 2013). Cela suggère que la région linker et le domaine HD sont importants pour l'activité anti-LINE-1. Et ceci est soutenu par le fait que les mutants de SAMHD1 impliqués dans l'AGS et dont les mutations sont concentrées dans le domaine HD inhibent également moins la rétrotransposition de LINE-1 que la protéine sauvage.

3.7.3 L'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 par SAMHD1 est-elle régulée par la phosphorylation ?

La régulation de l'activité anti-L1 de SAMHD1 est très controversée dans la littérature. Selon Zhao et al, la phosphorylation de SAMHD1 sur le résidu T592 n'a pas d'effet sur la rétrotransposition de L1. Pourtant, selon Herrmann et al, le mutant phospho-ablatif T592A inhibe L1 encore plus fort que la protéine sauvage, suggérant que la phosphorylation régule négativement l'activité anti-L1. Toutefois, l'activité enzymatique de SAMHD1 est primordiale puisque les mutants du cœur catalytique ne sont pas capables d'inhiber L1 et ce, même en absence de phosphorylation (mutants T592A/D311N et T592A/D207N).

De manière surprenante, le phénotype inverse de régulation par la phosphorylation est observé sur le résidu S33 de SAMHD1 dans une population Coréenne. En effet, chez ces individus, le codon à l'origine de S33 présente deux polymorphismes : S33Y et S33A (White et al., 2016). Le premier, S33Y qui mime un encombrement stérique, inhibent la rétrotransposition de LINE-1 ; le second, S33A qui mime une phospho-ablation, permet une meilleure rétrotransposition suggérant dans ce cas, que la phosphorylation régule positivement l'activité anti-L1 (White et al., 2016). Tout comme la protéine sauvage, les variants S33A et S33Y ne présentent pas de défauts structuraux, enzymatiques ou de localisation.

3.7.4 Quelle étape de la mobilité de LINE-1 est ciblée par SAMHD1 ?

Des études proposent que SAMHD1 n'altère pas l'expression de l'ORF1p (« open reading frame 1p ») de LINE-1 (Hu et al., 2015; Zhao et al., 2013) mais réduit considérablement celle de l'ORF2p. De manière similaire, SAMHD1 inhibe l'ORF2p des rétro-éléments Alu et SVA.

Cependant une autre équipe indique que SAMHD1 n'interfère pas avec l'activité du promoteur de l'ORF2p, ne réduit pas les niveaux d'ARN de L1 ou des ribonucléoprotéines de L1, ni les niveaux d'expression des ORF1p et ORF2p (Herrmann et al., 2018). Selon eux, SAMHD1 interfère avec la rétrotransposition en interagissant directement avec les complexes ribonucléoprotéiques de L1.

3.7.5 SAMHD1 séquestre LINE-1 dans les granules de stress

Il a été montré que l'ORF1p, en présence de SAMHD1, forme de grands foci cytoplasmiques dans lesquels on détecte l'expression des marqueurs de granules de stress TIA1 et G3BP1 (Hu et al., 2015). Lorsque ces marqueurs sont sur-exprimés dans des cellules HeLa, on observe une diminution de la rétrotransposition de LINE-1. Il est proposé que les granules de stress ont un rôle direct dans le contrôle de LINE-1 et que SAMHD1 séquestre ORF1p dans ces granules de manière indirecte.

3.7.6 Conservation et inhibition d'autres rétro-éléments

Chez la souris, les deux isoformes ISF1 et ISF2 restreignent efficacement LINE-1 (Herrmann et al., 2018; Hu et al., 2015). Comme chez l'humain, les mutations affectant l'activité enzymatique ou le site allostérique des ces isoformes réduisent l'activité anti-LINE-1, bien que cette réduction soit moins forte pour l'ISF2 qui est hautement active contre LINE-1. Chez la souris aussi l'activité anti-LINE-1 de SAMHD1 est régulée par la phosphorylation puisque la mutation phospho-ablative du résidu T603 (homologue du résidu humain T592) permet à l'ISF1 de restreindre d'avantage LINE-1.

De manière intéressante la protéine SAMHD1 humaine peut agir contre LINE-1 chez la souris et inversement (Zhao et al., 2013). L'activité anti-LINE-1 de SAMHD1 est plus forte encore chez les primates non humains tel que *Nomascus leucogenys* et *Macaca mulatta*, chez le chien *Canis lupus* et chez les bovins *Bos Taurus*. Ces résultats indiquent que l'inhibition de LINE-1 par SAMHD1 est un mécanisme plutôt bien conservé chez les mammifères. Enfin SAMHD1 est active contre d'autre rétro-éléments puisqu'elle inhibe la rétrotransposition d'AluY et des rétro-éléments murins MusD et IAP.

La rétrotransposition de LINE-1 peut dans certains cas résulter en des maladies génétiques causées par l'interruption d'un gène, la délétion ou la duplication de nucléotides et l'instabilité chromosomique due à des recombinaisons hétérologues (Hancks et Kazazian, 2012). Chez l'Homme, LINE-1 peut être à l'origine des cancers du foie, du colon ou du sein (Heikenwalder et Protzer, 2014), d'où l'importance de SAMHD1 dans la protection du génome. De manière intéressante la capacité de SAMHD1 à inhiber la rétrotransposition de LINE-1 passe par un mécanisme différent de celui qui lui permet de bloquer le VIH-1. Une possibilité est que le domaine SAM de SAMHD1 interagisse avec l'ARN en cours de rétrotransposition et bloque le processus par un encombrement stérique.

3.8 Implications cliniques

3.8.1 Syndrome d'Aicardi-Goutières

Aicardi et Goutières donnent leurs noms à un syndrome qu'ils découvrent et caractérisent en 1984 lors de l'étude de huit enfants atteints d'une maladie neurologique progressive (Aicardi et Goutières, 1984). Cette encéphalopathie se caractérise par la combinaison d'une calcification des ganglions de la base (autrement appelés noyaux gris centraux), d'une hypodensité de la substance blanche, d'une atrophie cérébrale diffuse et d'une augmentation du nombre de leucocytes dans le liquide cérébro-spinal (on parle de pléocytose) ; et se traduit chez ces enfants par la mort dans la première année de leur vie.

Les caractéristiques cliniques de l'AGS miment celles d'une infection congénitale virale (Lebon et al., 2002) comme par exemple une forte production d'IFN- α (Lebon et al., 1988). Les ressemblances entre les caractéristiques cliniques de l'AGS et les complications dues à une infection virale congénitale sont tellement fortes qu'il est suggéré que les mécanismes de leur pathogenèse soient les mêmes.

Des études menées sur les membres consanguins de plusieurs familles atteintes de l'AGS ont permis de situer les loci de la maladie dans le génome (Crow et al., 2006a, 2006b).

Le premier locus, AGS1, est situé sur le chromosome 3p21 et correspond au gène codant pour TREX1, la principale 3'->5' ADN-exonucléase chez les mammifères (Crow et al., 2006b). A partir des 10 familles étudiées, cinq mutations différentes ont été identifiées dans la séquence de TREX1 : une substitution au niveau d'un résidu impliqué dans la dimérisation, une duplication et une mutation faux sens de résidus situés dans le site catalytique, deux mutations de délétions qui entraînent la troncation de TREX1 soit par un déplacement du cadre de lecture soit par une mutation faux sens. L'activité exonucléase de TREX1 n'est pas détectable quand la protéine est issue de fibroblastes de patients atteints d'AGS comparé à la protéine issue de cellules saines indiquant que les mutations liées à ce syndrome entraînent une perte de fonction de TREX1.

Les trois autres loci AGS2 (chromosome 13q14.3), AGS3 (chromosome 11q13.2) et AGS4 (chromosome 19p13.13) correspondent respectivement aux gènes RNaseH2B, RNaseH2C, RNaseH2A codant pour les composants de l'enzyme RNaseH2 qui clive les ribonucléotides des complexes ARN/ADN. Les marques de l'AGS dans la séquence de RNaseH2B sont des mutations faux-sens non conservatives et des mutations non-sens induisant un codon stop. Ces perturbations réduisent l'activité de la protéine sans l'abolir (mutations hypomorphiques). Dans la séquence de RNaseH2C on trouve des mutations faux-sens, et dans la séquence de RNaseH2A on trouve une unique mutation faux-sens non conservative, G37S. Les trois sous-unités RNaseH2A, -B et -C interagissent *in vitro* (co-immunoprécipitation à partir de 239T) et le complexe qu'elles forment

possède une activité RNaseH2, la mutation G37S dans la RNaseH2A n'impacte pas la stabilité du complexe mais réduit fortement son activité (Crow et al., 2006a).

La perte de l'activité nucléase de TREX1 et de la RNaseH2 due à des mutations, résulterait en la survie et en l'accumulation aberrante d'ADN en cours de réparation ou de réplication, ce qui entraînerait inévitablement une réponse immunitaire innée anormale qui se traduirait par une production massive d'interféron alpha.

Il y a 17% des cas d'AGS pour lesquels les patients n'ont pas de mutations dans TREX1 ou RNaseH2, suggérant qu'un autre facteur cellulaire est impliqué. Pour l'identifier, un crible génomique basé sur la détection de polymorphisme nucléotidique a été réalisé chez des patients atteints d'AGS. Le 5^{ème} locus (sur le chromosome 20q11) correspond au gène de SAMHD1. Plusieurs exons du gène présentent des mutations de résidus très conservés (Rice et al., 2009). Tout comme cela a été montré chez TREX1, l'expression de SAMHD1 est régulée positivement par l'IFN. SAMHD1 pourrait donc, comme TREX1 et RNaseH2, avoir un rôle de protection contre l'auto-activation du système immunitaire inné.

La perte de fonction de TREX1 et SAMHD1 pourrait venir d'un défaut de localisation nucléaire. En effet, certaines mutations associées à l'AGS dans la séquence de TREX1, modifient sa localisation en perturbant le domaine transmembranaire qui lui permet d'être ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique (Yang et al., 2007). De manière similaire, certaines mutations de SAMHD1 entraînent sa délocalisation du noyau vers le cytoplasme (Goncalves et al., 2012; Rice et al., 2009).

3.8.2 Restriction du virus de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B (HBV) dépend, tout comme le VIH-1, de la disponibilité en dNTP pour la réplication de son génome ADN. Est-il alors possible de transposer les mécanismes de restriction du VIH-1 par SAMHD1 à celle du virus HBV ?

Dans les cellules HepG2.2.15 (issues des HepG2, cellules cancéreuses du foie) non-cyclantes, l'inhibition de l'expression de SAMHD1 augmente les niveaux d'ADNv du virus HBV et l'inverse est vrai puisque la sur-expression de SAMHD1 a pour effet de les diminuer. Comme les cellules HepG2.2.15 contiennent un génome HBV intégré, ce résultat suggère que SAMHD1 agit sur les phases tardives du cycle de réplication, entre la transcription et le relargage des particules (Sommer et al., 2016). Etant donné que les mutants du cœur catalytique D311A et D137N ne sont plus capables de restreindre le virus HBV, il est suggéré que les activités enzymatiques de SAMHD1, en particulier l'activité dNTPase, sont importantes.

Un autre point commun avec la restriction du VIH-1 réside dans l'incapacité du mutant phospho-mimétique T592E à restreindre le virus HBV, suggérant que ce mécanisme de restriction est régulé par la phosphorylation (Sommer et al., 2016). L'infection par HBV est contrôlée par l'IFN et les ISG (« interferon stimulated gene »). Par conséquent, l'expression de SAMHD1 induite par l'IFN pourrait contribuer à la réponse immune mise en place contre le virus.

3.8.3 Cancer et leucémie

A l'âge de 24 ans, un patient atteint d'AGS (possédant une mutation dans l'intron 14 qui résulte en un variant d'épissage de la protéine) a développé une leucémie lymphoïde chronique (LLC). Aucune mutation acquise au cours de la LLC n'est détectée chez ce patient et confirme une implication de SAMHD1 (Clifford et al., 2014). Dans une cohorte de 100 patients atteints de LLC, cinq d'entre eux présentent des mutations *de novo* dans SAMHD1 qui sont délétères pour la fonction cellulaire de la protéine. Trois mutations sont communes à l'AGS et la LLC : R145X, R145Q et I201N. De plus, les patients atteints de LLC présentent une chute des niveaux d'ARNm de SAMHD1.

La co-localisation de SAMHD1 avec p53BP1, une protéine qui participe à la réponse précoce dans les cassures à ADN, suggère un rôle de SAMHD1 dans la protection et la réparation de l'ADN. SAMHD1 faciliterait la recombinaison homologue en recrutant un facteur de résection au niveau de la cassure (Daddacha et al., 2017). La perte d'expression de SAMHD1 dans les cellules tumorales aboutirait à un défaut de réparation de l'ADN et à la mort cellulaire *in fine*. De plus, on peut corréler l'implication de SAMHD1 dans le contrôle du cancer à son activité de régulation négative du cycle cellulaire, de la croissance et de la prolifération (Bonifati et al., 2016).

4/ La SUMOylation : une modification post-traductionnelle réversible

4.1 Présentation des protéines SUMO

La famille des protéines SUMO pour « Small Ubiquitin-like MOdifier » a été découverte dans les années 1990 après la caractérisation d'une nouvelle forme de la protéine RanGAP1 (« Ran GTPase-activating protein 1 ») (Mahajan et al., 1997), puis par la mise en évidence que l'association de RanGAP1 avec RanBP2 (« Ran binding protein 2 ») à la périphérie cytoplasmique du pore nucléaire requiert la modification de RanGAP1 par SUMO-1 (Matunis, 1996).

Les protéines SUMO sont fortement conservées chez les eucaryotes (Gareau et Lima, 2010) : un seul homologue appelé STM3 a été mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh et Koshland, 1995) alors que l'on en dénombre au moins huit isoformes différents chez les plantes (Kurepa et al., 2003).

Depuis 1996, cinq protéines SUMO d'environ 12 kDa ont été décrites chez les mammifères : SUMO-1 (Boddy et al., 1996), SUMO-2 (Lapenta et al., 1997), SUMO-3 (Kamitani et al., 1998), SUMO-4 (Bohren et al., 2004) et SUMO-5 (Liang et al., 2016). Les protéines SUMO-2 et SUMO-3 partagent 95% d'identité de séquence. Ne différant que par trois résidus dans leur région N-terminale, elles sont identiques d'un point de vue immunogène et sont donc souvent considérées comme une seule entité protéique appelée SUMO-2/3. SUMO-1 et SUMO-4 partagent respectivement 45% et 86% d'identité de séquence avec SUMO-2/3. Les paralogues SUMO-1, -2 et -3 sont exprimés de manière ubiquitaire au sein de l'organisme. Pour autant, SUMO-1 est la plus exprimée et est retrouvée majoritairement sous forme conjuguée alors que SUMO-2 et SUMO-3 sont majoritairement sous forme libre et peuvent donc être mobilisées rapidement en condition de stress (Saitoh et Hinchev, 2000). Ces observations sont confortées par des expériences de FRAP (« Fluorescence Recovery After Photobleaching ») indiquant que la mobilité intracellulaire des protéines SUMO-2/3 est supérieure à celle de SUMO-1 (Ayaydin et Dasso, 2004). L'expression de SUMO-4 est limitée à certaines cellules telles que les cellules immunitaires, rénales et du pancréas. Le rôle de cette isoforme est peu certains, il semblerait que sa conjugaison se fasse en condition de stress et que le polymorphisme M55V soit associé à un risque accru de développer le diabète de type 1 (Bohren et al., 2004; Guo et al., 2004). Une étude très récente indique que SUMO-4 est également exprimée dans les cellules du placenta et intervient dans le développement de la pré-éclampsie, une condition clinique observable durant la grossesse (Baczyk et al., 2017). SUMO-5 est conservée chez les primates mais n'est pas retrouvée chez la souris ; elle possède une très forte identité de séquence avec SUMO-1 et est fortement exprimée dans les cellules des testicules et hématopoïétiques. Inductible en condition de stress, SUMO-5 poly-SUMOyle PML (« Promyelocytic leukemia protein ») sur le résidu K160 et jouerait un rôle important dans la formation des corps

nucléaires PML. La dé-conjugaison de SUMO-5 initierait la dégradation des corps nucléaires PML (Liang et al., 2016).

Les protéines SUMO appartiennent à la famille des Ubl ou « Ubiquitin-like proteins » car elles ont une structure tridimensionnelle proche de celle de l'Ubiquitine, même si elles ne partagent avec cette dernière que 18% d'homologie de séquence (Figure 21) (van der Veen et Ploegh, 2012). Les caractéristiques structurales des Ubl consistent en 1) un feuillet β qui enveloppe une hélice α dans un repliement sphérique et 2) un motif di-Glycine situé en région C-terminale et exposé après maturation protéolytique (Bayer et al., 1998; Su et Li, 2002).

Une caractéristique spécifique aux protéines SUMO, que l'on ne retrouve pas chez l'Ubiquitine, repose sur la présence d'une région N-terminale flexible d'environ 20 acides aminés (Figure 21B). Chez SUMO-2, -3, -4 et -5, cette région contient un site consensus de SUMOylation (centré sur le résidu Lysine en position 11 pour SUMO-2, -3 et -4 ; en position 18 pour SUMO-5), qui permet à ces paralogues de s'auto-modifier afin de former des chaînes polymériques (Bohren et al., 2004; Gill, 2004; Tatham et al., 2001). Ce motif n'est pas conservé chez SUMO-1 (Figure 21A), qui ne peut donc pas générer ces chaînes poly-SUMO. Ainsi, il est proposé que SUMO-1 serve de terminateur de chaîne (Bayer et al., 1998).

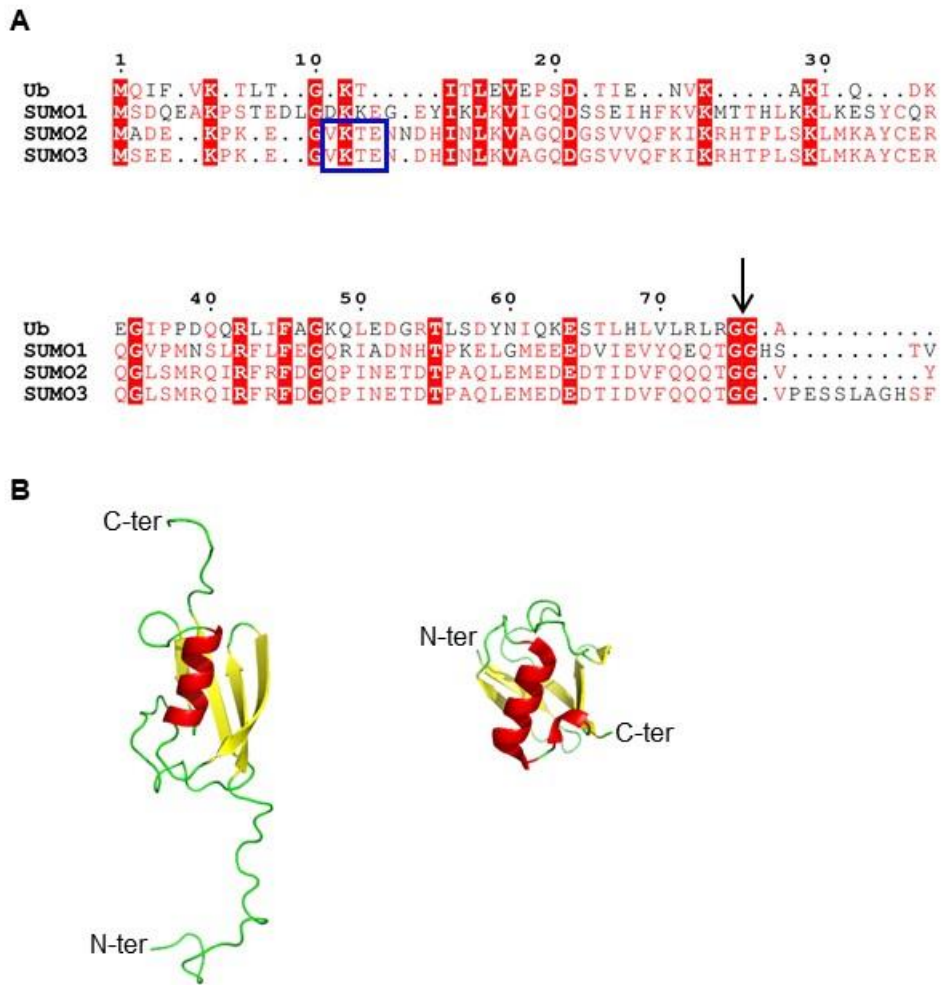


Figure 21. Comparaison des protéines SUMO et de l'Ubiquitine.

(A) Alignement des séquences des protéines humaines Ubiquitine (Ub) et SUMO-1, -2, -3. Les identités de séquence sont surlignées en rouge et les similarités écrites en rouge. Le motif consensus de SUMOylation présent chez SUMO-2 et -3 est encadré en bleu (résidus 10-13). Le motif di-Glycine en C-terminale est indiqué par la flèche. **(B)** Structures tri-dimensionnelles de SUMO-1 (gauche) et de l'Ubiquitine (droite). Les feuillets β sont colorés en jaune, les hélices α en rouge.

Au niveau moléculaire, la conjugaison des protéines SUMO peut avoir des conséquences variées comme un changement de conformation, la création d'une surface d'interaction ou l'introduction d'un encombrement stérique favorisant ou entravant l'interaction avec un partenaire. Ceci se traduit par la modification de l'activité et/ou de la localisation de la protéine cible. Dans la cellule, les protéines SUMO participent à la régulation de divers processus tels que la transcription et la réplication de l'ADN (García-Rodríguez et al., 2016), la transduction du signal (Yamashita et al., 2004), l'import nucléaire (Huang et al., 2003) ou la progression du cycle cellulaire (Eifler et Vertegaal, 2015). Elles sont aussi impliquées dans la réponse aux stress tels que le choc thermique (Jongjitwimol et al., 2016), les dommages à l'ADN et le stress oxydatif (Enserink, 2015; Hickey et al., 2012). Enfin, d'un point de vue clinique, la SUMOylation intervient dans l'étiologie des

cancers (Bellail et al., 2014; Coppola et al., 2009; Seeler et Dejean, 2017), dans les maladies cardiaques (Da Silva-Ferrada et al., 2016; Gupta et al., 2016; Liu et al., 2017) et neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer (Guerra de Souza et al., 2016; Juarez-Vicente et al., 2016; Martins et al., 2016; Mun et al., 2016), ainsi que dans la réplication des pathogènes.

4.2 Motifs de liaison covalente et non covalente des protéines SUMO

De manière générale, une protéine SUMO est liée de façon covalente à un résidu lysine (Capili et Lima, 2007; Geiss-Friedlander et Melchior, 2007; Johnson, 2004; Kerscher et al., 2006) inclus dans une séquence consensus de la protéine cible (Figure 22). Dans la plupart des cas le motif de SUMOylation correspond à la séquence consensus : ϕKxE (ϕ : acide aminé hydrophobe, x : n'importe quel résidu), qui représente le site de fixation de l'unique enzyme SUMO E2 de conjugaison Ubc9 (« Ubiquitin-like conjugating enzyme 9 ») (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007; Johnson, 2004; Kerscher et al., 2006; Pichler et al., 2005). La conjugaison de SUMO peut aussi avoir lieu sur le même motif mais inversé : $E/DxK\phi$ (Matic et al., 2010). Le substrat peut être mono- ou poly-SUMOylé (Figure 22, étape 4b). Des études de protéomique montrent toutefois que dans 25% des cas, la SUMOylation cible un résidu Lysine qui ne se trouve pas dans un motif consensus (Blomster et al., 2010). Sur la totalité des protéines identifiées comme des cibles de SUMO-2, environ 20% des sites de SUMOylation et d'ubiquitination se chevauchent (Hendriks et al., 2015).

Une fois conjuguées, les protéines SUMO constituent une plateforme d'interaction pour des liaisons non-covalentes à des co-facteurs ayant un ou plusieurs motifs SIM (« SUMO-interacting motif ») (Figure 22, étape 4c) (Kerscher, 2007; Minty et al., 2000; Song et al., 2004). Ces motifs sont composés d'un cœur hydrophobe dont la séquence consensus est : $(V/I)-(V/I)-X-(V/I)$ ou $(V/I)-X-(V/I)-(V/I)$, où X est n'importe quel résidu, V pour Valine et I pour Isoleucine. Cette séquence est souvent flanquée de résidus acides qui jouent un rôle dans l'affinité, l'orientation et la fonctionnalité de la liaison SIM-SUMO. Il existe aussi des motifs phospho-SIM qui contiennent des résidus Sérine ciblés par la phosphorylation (Stehmeier et Muller, 2009). Les motifs phospho-SIM sont considérés comme des plateformes au niveau desquelles la phosphorylation facilite la SUMOylation.

Les motifs SIM ont été identifiés dans de nombreuses protéines de la machinerie de SUMOylation telles que les SUMO E3 ligases de la famille PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT »), ainsi que dans des protéines effectrices. L'exemple le plus marquant est celui des STUbL ou « SUMO-Targeted Ubiquitin ligases » qui contiennent des SIM positionnés en tandem (voir paragraphe suivant) (Perry et al., 2008).

4.3 Les STUbL font le lien entre SUMOylation et ubiquitination

Pendant longtemps la communauté scientifique a supporté un modèle selon lequel la SUMOylation ne serait pas impliquée dans la dégradation des protéines, favorisant au contraire leur stabilisation par compétition avec l'ubiquitination lorsqu'un résidu Lysine est ciblé par ces deux processus post-traductionnels. L'identification des protéines « SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases » ou STUbL a pourtant permis de mettre en évidence un lien essentiel entre la SUMOylation et l'ubiquitination dans le processus de dégradation des protéines par le protéasome. Initialement caractérisées chez la levure (Xie et al., 2007), les STUbL sont importantes pour assurer des niveaux constants des protéines SUMOylées dans la cellule (Perry et al., 2008; Prudden et al., 2007). D'un point de vue structural, les STUbL possèdent un domaine RING qui interagit avec une enzyme E2 de conjugaison de l'Ubiquitine, et les définit comme des Ubiquitine E3 ligases (Prudden et al., 2007). Elles contiennent également plusieurs motifs SIM positionnés en tandem qui leur permettent d'interagir avec une protéine multi-SUMOylée ou poly-SUMOylée (Tatham et al., 2008 ; Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Leur activité Ubiquitine E3 ligase entraîne la formation de chaînes d'ubiquitine puis la dégradation du complexe par le protéasome (Sriramachandran et Dohmen, 2014).

Chez l'Homme, deux STUbL ont été identifiées à ce jour. RNF4 (« RING finger protein 4 ») (Sun et al., 2007) est notamment responsable de la dégradation par le protéasome de la protéine PML ainsi que de l'oncogène PML-RAR α retrouvé chez les patients atteints d'APL (« Acute Promyelocytic Leukemia »), suite au traitement au trioxyde d'arsenic (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Le mécanisme proposé suggère que l'arsenic augmente la SUMOylation de PML, favorisant le recrutement de RNF4, qui catalyse alors la formation de chaînes poly-ubiquitine sur PML SUMOylée, induisant ainsi sa dégradation. Une étude récente visant à identifier les cibles d'RNF4 indique que cette dernière interagit avec l'enzyme SUMO E2 de conjugaison Ubc9 ainsi qu'avec plusieurs SUMO E3 ligases telles que PIAS1, PIAS2 et PIAS3 (Kumar et al., 2017). RNF4 est recrutée aux sites de dommages à l'ADN et son action est requise pour la réparation des lésions (Vyas et al., 2013). RNF4 agit donc comme principal régulateur de la voie de SUMOylation lors de cassures double brin.

La protéine RNF111/Arkadia (« RING finger protein 111»), un activateur de la voie de transduction du signal contrôlée par TGF- β (« transforming growth factor β »), est la deuxième STUbL exprimée chez l'Homme (Poulsen et al., 2013), qui participe à la dégradation par le protéasome de la protéine PML SUMOylée (Erker et al., 2013). Il a été montré qu'RNF111/Arkadia cible également la protéine poly-SUMOylée Nrf2, un facteur de transcription qui régule le système de défense des cellules contre le stress oxydatif (Nguyen et al., 2009).

4.4 Cycle de SUMOylation

Une protéine SUMO est synthétisée à l'état de précurseur immature ne pouvant pas être conjugué (Figure 22) (Gareau et Lima, 2010). L'étape de maturation, effectuée par les protéines SENP (« sentrin-specific proteases »), correspond au clivage protéolytique de la région C-terminale (Figure 22, étape 1) (Yeh et al., 2000). L'exposition du motif di-Glycine qui en résulte est indispensable pour la deuxième étape, ATP-dépendante consistant en l'adénylation de SUMO par l'enzyme E1 d'activation constituée par l'hétéro-dimère SAE1-SAE2 (Figure 22, étape 2) (Desterro et al., 1999). La protéine SUMO adénylée est ensuite liée à un résidu Cystéine conservé du site actif de l'enzyme E1 pour former un intermédiaire thioester SUMO~E1. Puis, la protéine SUMO est transférée à un résidu Cystéine du site actif de l'unique enzyme E2 de conjugaison Ubc9 pour former le thioester SUMO~E2 (Figure 22, étape 3) (Desterro et al., 1999). SUMO-1, -2 et -3 interagissent avec la région N-terminale d'Ubc9 et avec la même affinité. Bien que le thioester SUMO~E2 puisse se lier directement au substrat, une enzyme SUMO E3 ligase intervient dans certains cas pour faciliter cette étape (Figure 22, étape 4a).

Les enzymes SUMO E3 ligases peuvent agir selon deux voies majeures : 1) elles modifient la conformation du thioester SUMO~E2 de façon à la rendre optimale pour la catalyse, sans entrer en contact avec le substrat, c'est le cas de l'enzyme SUMO E3 ligase RanBP2 (Pichler et al., 2002) ; 2) elles forment un complexe avec le thioester SUMO~E2 et le substrat pour favoriser *in fine* le transfert de SUMO, c'est le cas des protéines de la famille Siz/PIAS (Schmidt et Muller, 2002). Récemment une nouvelle SUMO E3 ligase a été identifiée, ZNF451 (« Zinc finger protein 451 »), définissant une famille au mode d'action inédit. ZNF451 est spécifique de SUMO-2 et -3 et procède à la conjugaison de SUMO sur son substrat grâce à deux motifs SIM positionnés en tandem (Cappadocia et al., 2015; Eisenhardt et al., 2015 ; Koidl et al., 2016). Le premier SIM oriente SUMO vers son substrat tandis que le deuxième SIM fixe SUMO à Ubc9. ZNF451 possède également une activité élongase qui lui permet de synthétiser une chaîne poly-SUMO.

Tout comme la phosphorylation, l'ubiquitination et d'autres modifications post-traductionnelles, le processus de SUMOylation est réversible via l'action des SENP (protéases spécifiques à l'origine de la maturation du précurseur SUMO) (Takahashi et al., 2001). Grâce à leur activité isopeptidase, elles sont responsables de la dé-conjugaison des protéines SUMO de leur substrat (Figure 22, étape 5). Ces cycles dynamiques de SUMOylation/dé-SUMOylation résultent en une très faible fraction de la protéine modifiée à l'état d'équilibre.

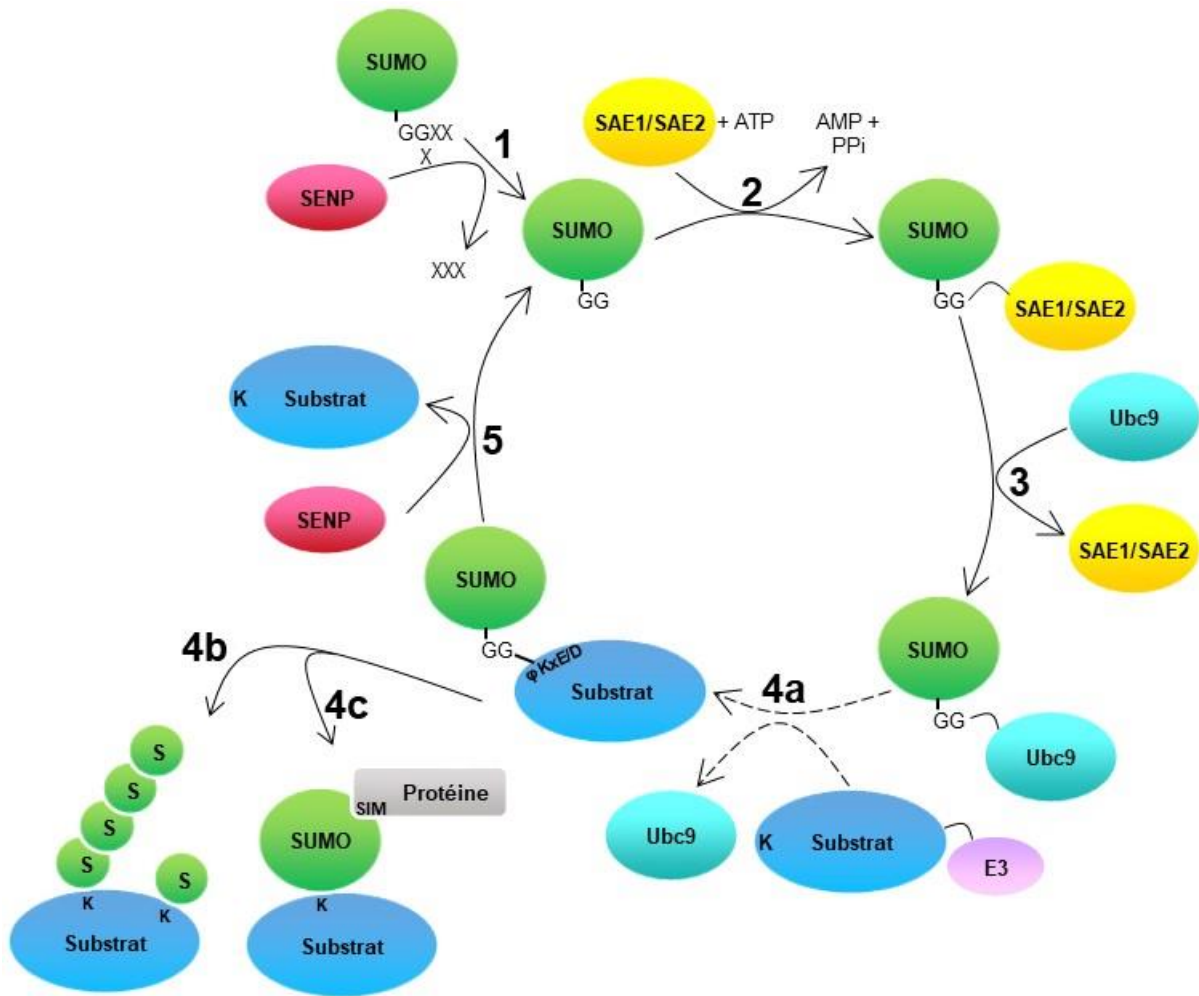


Figure 22. Le cycle de SUMOylation.

(1) Maturation du précurseur SUMO par la protéase SENP et exposition du motif di-glycine. (2) Formation ATP-dépendante du thioester SUMO-SAE1/SAE2 (enzyme d'activation). (3) Transfert de SUMO sur un résidu Cystéine du site actif de l'enzyme de conjugaison Ubc9. (4a) Le thioester SUMO-Ubc9 peut directement interagir avec le substrat ou nécessiter l'action d'une enzyme E3 SUMO ligase. SUMO modifie le substrat en se fixant au résidu Lysine situé dans un motif consensus de SUMOylation. Il existe différents modes de modification : (4b) le substrat peut être mono- ou poly-SUMOylé (liaison covalente) ; (4c) la protéine SUMO peut recruter sur le substrat une autre protéine via le motif SIM de cette dernière (liaison non covalente). (5) La protéine SUMO est détachée du substrat via l'action de la protéase SENP.

4.5 Implication de la SUMOylation dans la réplication des Rétrovirus

De nombreux travaux ont démontré l'implication de la SUMOylation dans la réplication virale. Afin de se maintenir dans leur hôte, les virus détournent les machineries cellulaires et mettent ainsi à leur profit des processus biologiques initialement destinés à la survie de la cellule. Comme la SUMOylation consiste en une cascade d'étapes, les protéines virales peuvent intervenir à différents

niveaux et exploiter chaque étape pour améliorer ou augmenter l'efficacité de réplication du virus (Mattoscio, 2013). De manière générale, on note trois aspects majeurs concernant le lien entre la réplication virale et la voie de SUMOylation : 1) l'interférence des protéines virales avec les protéines de la voie de SUMOylation (Colombo et al., 2002), 2) l'activité SUMO ligase, SUMO protéase ou STUbL des protéines virales (Chang et Kung, 2014) et 3) la SUMOylation des protéines virales (Yueh et al., 2006).

Bien que la SUMOylation intervienne dans la réplication de nombreux virus (avec une finalité positive ou négative pour la réplication de ce dernier), je n'aborderai dans ce manuscrit que le rôle de la SUMOylation chez les Rétrovirus.

4.5.1 SUMOylation et VIH-1

La SUMOylation chez les Rétrovirus a été moins étudiée que chez les virus à ADN. Pour autant, elle intervient à diverses étapes du cycle de réplication de deux Rétrovirus humains dont le VIH-1.

La protéine p6 du VIH-1 intervient dans le bourgeonnement du virus à la membrane cellulaire (Gottlinger et al., 1991) et dans l'incorporation de la protéine accessoire Vpr dans la particule virale (Kondo et Gottlinger, 1996). Elle a été la première protéine du VIH-1 pour laquelle une interaction avec la machinerie de SUMOylation a été montrée. La protéine p6 interagit avec Ubc9 et est modifiée par SUMO-1 sur le résidu Lysine en position 27 (Gurer et al., 2005). La sur-expression de SUMO-1 réduit d'un facteur quatre l'infectiosité des virions, suggérant que la SUMOylation de la protéine p6 régule négativement l'infectiosité du VIH-1. Pour autant, la mutation K27R n'a aucun effet sur la réplication du VIH-1 suggérant la présence d'autres sites de SUMOylation dans la polyprotéine Gag.

En accord avec cette hypothèse, l'interaction entre le précurseur Gag du VIH-1 et Ubc9 a été mise en évidence durant les phases tardives de l'infection (Bohl et al., 2013; Jaber et al., 2009). Les particules virales produites dans des cellules dans lesquelles l'expression d'Ubc9 est inhibée présentent un défaut d'infectiosité dû à une réduction de la stabilité de la glycoprotéine virale Env, qui conduit à une mauvaise incorporation dans les virions (Jaber et al., 2009). De plus, Ubc9 agit spécifiquement sur la sous-unité maturée SU/gp120 après le clivage protéolytique du précurseur gp160 et induit sa dégradation par les lysosomes (Bohl et al., 2013). Cependant, l'expression du mutant Ubc9 C93A, qui ne peut plus conjuguer SUMO-1 à ses cibles, n'a aucun effet sur Env suggérant que l'enzyme Ubc9 est importante pour la production de virions VIH-1 infectieux mais que sa propriété de conjugaison des protéines SUMO n'est pas impliquée (Bohl et al., 2013; Jaber et al., 2009).

La protéine IN du VIH-1, enzyme virale qui dirige l'intégration du génome viral rétro-transcrit dans celui de la cellule hôte (Vandegraaff et Engelman, 2007), est modifiée par les trois paralogues SUMO-1, -2 et -3 majoritairement au niveau de trois sites consensus conservés (Zamborlini et al., 2011). Lorsque les sites de SUMOylation de l'IN sont mutés, le virus perd son caractère infectieux. Ce défaut de réplication survient après la transcription inverse et avant l'intégration. Puisque l'intégrase mutée maintient son activité catalytique et interagit toujours avec l'un de ces partenaires cellulaires, LEDGF/p75, il a été proposé que la SUMOylation régule l'affinité de l'intégrase pour d'autres de ses co-facteurs et participe ainsi à une réplication virale efficace. Pourtant une étude montre que la sur-expression d'Ubc9, SUMO-1 ou -2 inhibe l'intégration sans impacter la transcription inverse et l'import nucléaire du PIC (Li et al., 2012). L'inhibition de la dé-conjugaison de SUMO par l'utilisation d'une molécule inhibitrice des SENP (SPI-0) induit un défaut d'intégration du VIH-1 (Madu et al., 2016). Par ailleurs, la protéine SUMO E3 ligase TRIM28/KAP1 interagit avec l'IN acétylée du VIH-1 et inhibe l'intégration (Allouch et al., 2011).

4.5.2 SUMOylation et HTLV-1

La protéine Tax du HTLV1 (« Human T-cell Leukemia Virus type 1 ») joue un rôle crucial dans la transformation et la prolifération des cellules infectées par le virus en partie à travers l'activation de la voie NFκB (Li et Gaynor, 2000). Tax est modifiée par l'ubiquitination et la SUMOylation sur les mêmes résidus Lysine en position 280 et 284 (Lamsoul et al., 2005). La SUMOylation a lieu dans le noyau, ce qui entraîne la rétention de Tax dans ce compartiment, ainsi que la formation de corps nucléaires enrichis en Tax au niveau desquels sont recrutés des facteurs de transcription incluant NFκB (Bex et McDowall, 1997; Kfoury et al., 2011; Nasr, 2006).

4.5.3 SUMOylation et MLV

La protéine CA du virus MLV fait partie du PIC et par conséquent joue un rôle clé lors des étapes précoces de l'infection (Fassati et Goff, 1999). Elle interagit avec Ubc9 et l'enzyme SUMO E3 ligase PIASy, et est modifiée par SUMO-1 (Yueh et al., 2006). Muter les sites de liaison d'Ubc9 et PIASy empêche la SUMOylation de CA et bloque la réplication du virus. Le défaut de réplication a lieu après la transcription inverse et avant l'assemblage des nouvelles particules virales : les mutants sont incapables de produire les ADN viraux circulaires ou d'intégrer le provirus. Cela suggère que la SUMOylation de la protéine CA du MLV par SUMO-1 via l'interaction avec Ubc9 et PIASy est requise pour le bon déroulement des étapes précoces du cycle de réplication du virus.

4.6 Cas particulier de la SUMOylation du facteur de restriction du VIH-1, TRIM5 α

TRIM5 α est un facteur de restriction qui impose une barrière antivirale inter-espèces : les protéines TRIM5 α ne peuvent pas contrer les Rétrovirus trouvés naturellement dans la même espèce, a contrario elles sont fortement actives contre les Rétrovirus trouvés dans d'autres espèces.

TRIM5 α humaine interagit avec SUMO de manière non covalente et possède quatre motifs SIM potentiels. La mutation ponctuelle de trois d'entre eux, situés dans le domaine SPRY, entraîne l'inhibition de l'activité antivirale de TRIM5 α humaine contre le virus N-MLV ainsi que celle de TRIM5 α rhésus contre le VIH-1, qui peut être expliquée par la perte d'interaction de TRIM5 α avec la capsid virale (Arriagada et al., 2011; Brandariz-Nuñez et al., 2013b; Lukic et al., 2013; Nepveu-Traversy et al., 2016). Cependant, la fonctionnalité des SIM identifiés n'a pas été testée et leur rôle dans le mécanisme de restriction a été remis en question. En effet, l'analyse de la structure tridimensionnelle du domaine SPRY montre que les motifs en question sont enfouis à l'intérieur du repliement protéique (Brandariz-Nuñez et al., 2013b). Ainsi, la substitution de résidus hydrophobes en résidus Lysine altérerait le repliement de la protéine et donc sa fonctionnalité.

Ces observations n'expliquent pas comment la sur-expression de SUMO-1 confère à TRIM5 α une meilleure activité antivirale (Arriagada et al., 2011; Lukic et al., 2013). Il a été suggéré que cela vienne de la modification covalente de TRIM5 α par SUMO-1 et -2 sur le résidu Lysine en position 10 (Dutrieux et al., 2015). Pourtant, la mutation K10R n'affecte pas l'activité antivirale de TRIM5 α (Dutrieux et al., 2015; Nepveu-Traversy et Berthoux, 2014) mais réduit fortement sa capacité à former des chaînes d'ubiquitine poly-K63 et à activer NF κ B et AP-1 (Nepveu-Traversy et Berthoux, 2014). Plus récemment, Portilho et al ont observé dans les cellules dendritiques que la séquestration de TRIM5 α dans des corps nucléaires dépend de sa SUMOylation et est requise pour le déclenchement de la réponse IFN (Portilho et al., 2016). Ces observations font cependant l'objet d'une controverse. En effet, Brandariz-Nuñez et al n'ont observé aucune interaction entre TRIM5 α rhésus et SUMO-1 et montrent que l'inhibition de la SUMOylation n'altère pas la propriété antivirale de TRIM5 α (Brandariz-Nuñez et al., 2013b).

Il est donc difficile de conclure quant au rôle de la SUMOylation de TRIM5 α . Il semblerait qu'elle module son activité ubiquitine ligase et soit importante pour le déclenchement de la réponse immunitaire innée mais des études supplémentaires sont requises pour approfondir cet aspect de la régulation de TRIM5 α .

5/ Problématique

Mon projet s'intègre dans un des principaux axes de recherche de mon équipe qui tend à caractériser l'interaction entre la machinerie cellulaire de SUMOylation et la réplication des VIH et autre rétro-éléments. Avant mon arrivée, mon équipe de recherche a publié des travaux montrant que l'intégrase du VIH-1 est modifiée par la SUMOylation, que cette modification semble être requise pour une réplication optimale (Zamborlini et al., 2011) et que la SUMOylation joue un rôle dans l'établissement d'un état antiviral qui dépend de l'IFN (Sahin et al., 2014). Partant de là, je me suis intéressée au facteur de restriction SAMHD1 qui limite la réplication du VIH-1 seulement dans les cellules qui ne se divisent pas. Le développement de mon travail est basé sur des données contradictoires de la littérature concernant le fonctionnement et la régulation de SAMHD1 et suggérant l'intervention d'autres mécanismes que ceux décrits. La phosphorylation ne pouvant pas expliquer à elle seule la régulation de SAMHD1, je me suis demandée si la SUMOylation pouvait être impliquée et dans quelles mesures. Le but de ce projet est d'approfondir les connaissances sur SAMHD1 et de mettre possiblement en lumière un nouveau mécanisme impliqué dans la restriction du virus. Ce projet de recherche fondamentale garde aussi un but thérapeutique puisque la compréhension d'un mécanisme cellulaire combattant une infection peut mener à la mise au point de thérapies antivirales.

J'ai mené mon travail de recherche selon les axes suivants :

1. **La caractérisation de la SUMOylation de SAMHD1** : depuis l'analyse *in silico* jusqu'aux expériences biochimiques pour confirmer les données de la littérature et les approfondir.
2. **La détermination du rôle de la SUMOylation dans les activités de SAMHD1** : élucider l'impact de la SUMOylation sur les activités cellulaire et antivirale de SAMHD1
3. **Décrire l'inter-relation entre la phosphorylation et la SUMOylation de SAMHD1**
4. **L'identification de partenaires de SAMHD1 SUMOylée** : identifier de potentiels partenaires impliqués dans le mécanisme de restriction, via des approches protéomique et transcriptionnelle.

Les deux premiers points font l'objet d'un article prochainement soumis et présenté en Partie

1. Les deux autres points sont présentés dans les Parties 2 et 3 sous forme de résultats obtenus, préliminaires ou en cours d'obtention.

RESULTATS

Première partie : Caractérisation du rôle de la SUMOylation dans les activités de SAMHD1, un facteur de restriction du VIH-1.

1/ Objet de l'étude

SAMHD1 (« Sterile alpha motif and HD domain-containing protein 1 ») est une protéine cellulaire qui a récemment été identifiée comme un important facteur de restriction du VIH-1 dans les cellules non-cyclantes, capable de réduire les niveaux de dNTP dans la cellule mettant ainsi en place un environnement sous-optimal pour le bon déroulement de la transcription inverse du virus (Ballana et Esté, 2015 ; Ahn et al., 2016). Malgré d'intenses investigations, la raison pour laquelle SAMHD1 opère exclusivement dans les cellules qui ne se divisent pas échappe encore à la communauté scientifique. De plus en plus de données suggèrent que les activités dNTPase et antivirale de SAMHD1 peuvent être distinguées et portent à croire qu'il existe une fonction non connue de la protéine.

Sachant que SAMHD1 est régulée par la phosphorylation dans les cellules cyclantes, nous nous sommes demandés comment SAMHD1 est régulée dans les cellules non-cyclantes. De plus, SAMHD1 a été identifié comme partenaire des protéines SUMO dans des études de spectrométrie de masse visant à établir le SUMOylome. La SUMOylation est une modification post-traductionnelle ressemblant fortement à l'Ubiquitination, et impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires de régulation des protéines.

Le but de cette étude est de déterminer si la SUMOylation joue un rôle dans la régulation du facteur de restriction SAMHD1. Dans un premier temps, il s'agit de confirmer que SAMHD1 est modifiée par les protéines SUMO et de déterminer avec précision les résidus ciblés par l'interaction avec ces protéines. Dans un deuxième temps, le but est de caractériser les conséquences d'une telle modification du facteur de restriction, du point de vue de sa fonction antivirale mais aussi de ses fonctions cellulaires.

Le travail présenté ci-dessous est en cours de soumission dans le magazine scientifique *Retrovirology*.

2/ Article

Impairing SAMHD1 SUMOylation does not alter restriction nor dNTPase activity

Martinat C¹, Cormier A¹, Palmic N¹, Tobaly-Tapiero J¹, Coggins SA², Kim Baek², Florence Margottin-Goguet³, Saïb A¹, Zamborlini A^{1,4}

¹Inserm U944 – CNRS/P7 UMR 7212, IUH, Paris, France;

²Center for AIDS Research, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA;

³Inserm U1016 – UMR8104, Institut Cochin, Paris, France;

⁴Laboratoire PVM Cnam, Paris, France

ABSTRACT

In recent years, SAMHD1 has emerged as an important cellular factor that limits the replication of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) at the reverse transcription step in non-cycling immune cells. Viruses of the HIV-2/SIV_{smm} lineage overcome this restriction by encoding the Vpx protein, which bridges SAMHD1 to the proteasomal degradation pathway. A wealth of experimental evidence indicates that SAMHD1 dNTPase activity, which is responsible for cellular dNTP pools depletion, accounts for the premature termination of viral replication. Notably, SAMHD1 expression is not sufficient to render any tested cell type resistant to HIV-1. Thus, SAMHD1-dependent restriction is regulated in a cell-type specific manner, but the underlying mechanisms are still unclear. Phosphorylation of residue T592 is proposed to downregulate the antiviral function of SAMHD1 in cycling cells. Intriguingly, non-cycling cells expressing phosphomimetic SAMHD1 variants (T592D/E) support HIV-1 infection, although their dNTPase activity appears intact. In addition, expression of an unphosphorylatable mutant (T592A) is not sufficient to inhibit HIV-1 replication in cycling cells. These and other results indicate that SAMHD1-mediated restriction may neither exclusively rely on its dNTPase activity, nor solely depend on the phosphorylation status of T592. We showed that HIV-1 infection of differentiated cells is enhanced by inhibition of the SUMOylation, i.e. a post-translational modification consisting in the reversible conjugation of SUMO moieties on a target protein. We have demonstrated that SAMHD1 undergoes SUMOylation on two major sites but their mutation influence neither its antiviral properties nor its dNTPase activity. These results suggest that another SUMO site may exist, non-covalent SUMOylation may be involved, or another cellular co-factor may play a crucial role in antiviral activity of SAMHD1.

INTRODUCTION

SAMHD1 is a host factor that inhibits HIV-1 replication in non-cycling immune cells of the myeloid lineage and resting T cells (1–4). Related viruses of the HIV-2/SIV_{smm} (Sooty Mangabey Monkey) lineage counteract this block by expressing Vpx, an accessory protein that promotes the proteasomal degradation of SAMHD1 by loading it onto the CUL4A-DDB1-DCAF1 Ubiquitin E3 ligase complex (3, 4). SAMHD1 is a GTP-dependent triphosphohydrolase (dNTPase) that converts dNTPs into the deoxynucleoside and triphosphate components (5–7). This activity contributes to maintain the intracellular dNTP pool homeostasis and, as a consequence, to cell cycle control and genome stability (8). Numerous studies showed that perturbing either the catalytic site or the assembly of dNTPase-competent tetramers abolishes SAMHD1 antiviral function (3, 4, 11). On these basis, the current model proposes that the antiviral activity of SAMHD1 relies on its ability to hydrolyze cellular dNTPs, keeping their concentration below a threshold required for viral reverse transcription (RT) (5, 11, 12).

Given that SAMHD1 is ubiquitously expressed, even in cells that readily support HIV-1 replication, a major question is how its antiviral function is regulated. It is now well established that SAMHD1 undergoes Cyclin/CDK-mediated phosphorylation on residue T592 in HIV-1-permissive cells, but not in cells that resist infection (2, 17–19). A role of T592 phosphorylation in the regulation of SAMHD1 antiviral activity is also supported by finding that SAMHD1 mutants which harbor the phosphomimetic T592E or T592D mutation do not restrict HIV-1 infection of non-cycling cells. However, several converging observations challenge this hypothesis. First, expression of the unphosphorylatable T592A SAMHD1 mutant is not sufficient to block HIV-1 replication in cycling cells (17, 18, 20). Second, the dNTPase activity of SAMHD1 phosphomimetic mutants is intact (9, 10, 15, 18). Third, the reduced effectiveness of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dividing cells has been ascribed to SAMHD1, indicating that the dNTPase activity is functional under these conditions (21). Altogether these observations raise the possibility that viral restriction mediated by SAMHD1 does not exclusively rely on its dNTPase activity, and/or is not exclusively regulated by phosphorylation of T592.

SUMOylation is an eukaryotic post-translational modification that is emerging as an important regulator of viral infection (22, 23). It consists in the conjugation of Small Ubiquitin-like Modifiers (SUMOs) to a protein substrate by an enzymatic cascade relying on SUMO-specific activating (E1), conjugating (E2) and ligating (E3) enzymes (reviewed in 24). SUMO-specific proteases (SENPs) reverse this process freeing SUMO and the unmodified protein. SUMO moieties are usually covalently bound to a Lysine (K) residue within the consensus motif: ϕ KxAc (ϕ : hydrophobic amino acid, x: any amino acid and Ac: an acidic residue). At the molecular level, SUMOylation modulates the properties of the target protein in different ways, including changes in conformation, cellular localization, enzymatic activity... Conjugated SUMO moieties can also create a binding surface for SUMO-interacting motif (SIM)-containing proteins (25), which mediate the downstream consequences of SUMOylation. Viruses interfere with the cellular SUMO system hindering the

modification of host proteins or using their own proteins as substrates for SUMO to create a favorable environment for replication (22, 23). Increasing evidence also indicates that host proteins involved in intrinsic and innate immunity are SUMOylated, suggesting an extensive involvement of this post-translational modification in the control of immune processes (reviewed in 26). We have previously shown that SUMO levels rise in cells exposed to interferon (IFN), which become resistant to infection. Conversely, silencing of SUMO proteins enhances HIV-1 replication in IFN-treated cells. On the bases of these results we concluded that SUMOylation plays a role in the establishment of an IFN-dependent antiviral state (27). IFN treatment has also been shown to upregulate the expression of proteins known to restrict cells from HIV-1 infection, such as Trim5 α , APOBEC3 family members, MxB, Thetherin/BST2 and SAMHD1. Thus, it is tempting to speculate that these restriction factors are modified by SUMO, which eventually regulates their antiviral properties.

In this study, we investigated the role of SUMOylation in SAMHD1 activities. We showed that SUMOylation inhibition favors infection of differentiated cells by SAMHD1-sensitive viruses, that SAMHD1 is SUMOylated *in vitro* by SUMO-2 mostly on K469 and K622, and that SUMOylation-deficient SAMHD1 mutants expressed in non-cycling cells have WT antiviral and dNTPase activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell lines and reagents

HeLa and 293T cells were grown in DMEM (Invitrogen). U937 and THP1 were grown in RPMI (Invitrogen). Media were supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), 100 units/mL of penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Stable cell lines were obtained by transduction with HIV-1-based lentiviral vectors harboring the sequence of WT or mutant HA-SAMHD1 or 3Flag-Vpx. Cells having integrated the transgene were selected with puromycin (4 μ g/mL) for 7 days. Monocytic U937 and THP1 cell lines were differentiated by treatment with phorbol-12-myristate-13-acetate (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) for 24 hours. All cell lines were mycoplasma-free as confirmed by mycoplasma check testing (GATC biotech). Antibodies used are the following: mouse anti-HA11 (Covance), sheep anti-SUMO1 (ENZO), rabbit anti-SUMO2/3, mouse anti-SAMHD1, rabbit anti-PT592-SAMHD1 (Cell Signaling), rabbit anti-actin, anti-HA HRP (ABCAM), anti-Flag HRP (SIGMA).

Plasmid construction and mutagenesis

pMD2.G encodes the VSVg envelope protein (a gift from D. Trono). pNL4-3EnvFsGFP contains a complete HIV-1 provirus with an *env*-inactivating mutation and *EGFP* inserted in the place of the Nef-coding gene (a gift from D. Gabuzda). HIV-2 ROD9 Δ env-GFP (WT or Δ Vpx) was described previously (36). His-SUMO1, 2 and 3 were already described (37). The Vpx gene from SIV_{smm} fused at 5' in frame with three repetitions of the Flag coding sequence was cloned into the pTRIPZ vector in the place of the TurboRFP gene. HA-SAMHD1 was constructed by N. Landau. SAMHD1 mutants

were generated using the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit according to the manufacturer's instructions (NEB). The entire SAMHD1 coding fragment was confirmed by sequencing (GATC biotech).

Purification of His-tagged protein on Ni-NTA beads under denaturing conditions and immunoprecipitation assays

293T cells (3×10^6 cells/10-cm dish) were transfected using a calcium phosphate precipitation technique with plasmids encoding HA-tagged WT or mutant SAMHD1 proteins, and vectors expressing Ubc9 and His-SUMO1, SUMO2 or SUMO3 or an appropriate empty vector. After 40h, cells were lysed under denaturing conditions in buffer A (6M guanidium-HCl; 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; 10 mM imidazole; pH 8.0) and sonicated (10 cycles, 45sec pulse, 20sec pause with the Bioruptor™, Diagenode). Cell lysates were incubated with Nickel Nitrilotriacetic (Ni-NTA) agarose beads (QIAGEN) (3h, RT). Following extensive washing with decreasing concentrations of guanidium-HCl, bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer supplemented with 200 mM imidazole.

To analyze post-translational modification, cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (150mM NaCl, 0,4% NaDOC, 1% IGEPAL CA-630, 50mM Tris HCl pH 7,5, 5mM EDTA, 10mM NEM, 1mM DTT, proteases cocktail inhibitors) supplemented with 1% SDS and 1% Triton. After dilution in RIPA buffer, cell lysates were incubated with anti-HA.11 affinity matrix (BioLegend) (overnight, RT). For interaction experiments, 293T cells stably expressing 3Flag-Vpx under the control of the Tet-ON inducible promoter (0.5×10^6 cells/6-wp well) were transfected with plasmid encoding HA-SAMHD1 variants using a calcium phosphate precipitation technique. After 40h, cells were lysed as previously described. Cell lysates were pre-cleared by incubation with Protein A agarose-coupled beads (ROCHE) (1h, 4°C) prior to immunoprecipitation using the Pierce™ HA-Tag IP/Co-IP Kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli Sample buffer.

Total protein quantification and Western blotting

The total protein concentration was determined by Lowry's method using the DC Protein Assay Kit, according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad) with a dilution series of calibration standard (BSA). The optical density was measured at 750 nm using a plate reader (Berthold) with MikroWin 2010 software.

Whole cell lysates (WCL) and eluates were separated on a 4-12% gradient sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels (Bio-Rad) and transferred on a nitrocellulose membrane for immunoblotting. Proteins were detected with appropriated antibodies and immune-complexes revealed with HRP-conjugated secondary antibodies and enhanced chemoluminescence (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate).

Immunofluorescence, in situ proximity ligation assays (Duolink), and confocal microscopy

THP1, parental U937 and stable cell lines were seeded (0.4×10^6 cells/well) into 8-chamber culture slides (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, ThermoFisher Scientific). After fixation (4% paraformaldehyde/PBS, 15 min, 4°C) and permeabilization (ice-cold methanol, 5 min, 4°C) cells were incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer (5% BSA, 0,1% PBS-Tween20) (overnight, 4°C) followed by Alexa488-coupled secondary antibodies (1h, RT). Protein-protein interactions *in situ* were visualized using the Duolink® in situ proximity ligation assay (PLA) system (Olink Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Images were acquired using a laser-scanning confocal microscope (LSM510 Meta, Carl Zeiss) equipped with an Axiovert 200M inverted microscope, using a Plan Apo 63/1.4-N oil immersion objective.

Virus stock production and infectivity assay

Single-round viruses were produced by co-transfection of 293T cells using a standard calcium phosphate precipitation technique with the pNL4-3EnvFsGFP or HIV-2 ROD9 Δ env GFP or HIV-2 ROD9 Δ env GFP Δ Vpx and a VSVg-expression vector (pMD2.G). Supernatants were collected 40h post-transfection, filtered through 45 μ m-pore size filters and concentrated by ultracentrifugation (24 000 rpm, 2h, 6°C) using a SW32 rotor (Beckman) on a 20% sucrose cushion. The infectious titer was defined by infecting of permissive cells (293T or U937 cells) with serial dilutions of each viral stocks. After 48h, the percentage of GFP-expressing cells was measured by flow cytometry on a FORTESSA flow cytometer with BD FACS DIVA software (BD Biosciences).

SAMHD1 restriction and degradation assay

U937 cell lines ($0,3 \times 10^6$ cells) were seeded in 12-well plate and differentiated by treatment with PMA (100ng/mL, 24 h). After 48 h cells were challenged with VSVg-pseudotyped HIV-1-GFP, HIV-2 or HIV-2 Δ Vpx. The number of infected cells after 48 h was quantified by flow cytometry on a FORTESSA flow cytometer with BD FACS DIVA software (BD Biosciences).

To test the sensitivity of SAMHD1 WT or mutants to Vpx-mediated degradation, cells were harvested 8h after infection and marked with Anti-HA tag antibody [16B12] (DyLight® 650) (ab117515) using eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set according to manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). The number of HA positives cells was quantified by flow cytometry on a FORTESSA flow cytometer with BD FACS DIVA software (BD Biosciences).

Cellular dNTPs quantification by primer extension assay

U937 stable cell lines, differentiated with PMA or not, were harvested in ice-cold 65% methanol, lysed by incubating 3min at 95°C and dried using a vacuum concentrator. Dried samples were then analyzed for dNTP content as previously described (11).

Statistical analyses

Experiments are presented as mean \pm SD. One-way ANOVA test was used for comparison between groups, using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A p-value of 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Inhibition of SUMOylation enhances the permissivity of differentiated THP1 cells to HIV-1 and HIV-2 Δ Vpx viruses

Having previously shown that the SUMO system contributes to the establishment of an IFN-dependent antiviral state in HeLa cells (27), we set to investigate further the effect of modulating SUMOylation on the susceptibility of immune cells to retroviral infection. To this aim monocytic THP1 cells, pre-treated or not with IFN α , were incubated with ginkgolic (GA) or anacardic acid (AA), two small molecules inhibitors of the E1 SUMO activating enzyme (28), and two hours later were challenged with VSVg-pseudotyped HIV-1 viruses expressing the GFP reporter (VSVg/HIV-1-GFP) (Figure 1A). As expected, cells exposed to IFN α were less susceptible to HIV-1 infection (Figure 1B). Incubation with GA or AA did not alter cell permissivity to the virus (Figure 1B). In parallel, we tested the consequences of inhibiting SUMOylation on the infection of non-dividing cells. Accordingly, we treated THP1 cells with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) to induce their differentiation into macrophage-like cells, and next incubated them with IFN α and/or GA or AA before challenge with VSVg/HIV-1GFP (Figure 1A). Upon cellular differentiation, susceptibility to HIV-1 infection decreased about 25-fold compared to cycling cells, and was further reduced by IFN α treatment. In agreement with previous observations (27), inhibition of SUMOylation at least partially relieved the negative effect of IFN α (Figure 1C). Notably, inhibition of SUMOylation also enhanced the susceptibility of untreated THP1 cells to HIV-1 under these experimental settings (Figure 1C). We also assessed the permissiveness of differentiated THP1, treated or not with IFN α and/or GA, to VSVg-pseudotyped GFP-expressing HIV-2 or HIV-2 Δ Vpx. As shown in Figure 1D, SUMOylation inhibition did not affect the percentage of HIV-2-infected cells, regardless of whether they were pre-incubated or not with IFN α . Importantly, the infectivity rate of HIV-2 Δ Vpx, which is restricted by SAMHD1 in differentiated THP1 cells, increased upon treatment with GA (Figure 1E). Altogether, these data indicate that inhibition of SUMOylation increases specifically the infectivity of viruses that are sensitive to SAMHD1-mediated restriction.

We then asked whether treatment with GA or AA might alter the levels of SAMHD1 and/or its phosphorylation on T592, which is believed to inactivate its antiviral activity. As shown in Figure 1F, a 2-hours treatment with GA or AA did neither detectably change the amounts of unmodified and phosphorylated SAMHD1 nor the global levels of SUMO2/3-modified proteins (Figure 1F). We also

performed a DuoLink *in situ* proximity ligation assay (PLA) to investigate the interaction between SAMHD1 and SUMO in differentiated THP1 cells. Fluorescent dots indicating proximity between SAMHD1 and SUMO (distance < 40 nm (29)) were readily detected in the nucleus of PMA-treated THP1 cells, but not U937 cells (data not shown), and overlapped with the distribution of SAMHD1 simultaneously assessed by standard immunostaining (Figure 1G). Incubation with GA for 2 hours did neither alter SAMHD1 expression nor localization, as compared to untreated cells, but completely abolished the PLA signal (Figure 1G).

In conclusion, our data show that the enhanced permissiveness of differentiated THP1 cells to HIV-1 and HIV-2ΔVpx correlates with the loss of the interaction between SAMHD1 and SUMO proteins.

SAMHD1 is modified by SUMO2 and SUMOylated forms are enriched upon proteasome inhibition

To establish whether SAMHD1 is modified by SUMOylation, we adopted a cell-based assay where HA-SAMHD1 and each SUMO paralogue bearing an N-terminal 6-Histidine tag were expressed in 293T cells together with Ubc9, the only SUMO E2 conjugating enzyme. Thirty hours later, cells were treated overnight with the proteasome inhibitor MG132, which favors the accumulation of SUMO-conjugated proteins (30), or left untreated. Next, cells were harvested and split in two aliquots, one of which was subject to lysis in strong denaturing conditions to inhibit the highly active SUMO proteases and prevent deSUMOylation. After elution, SUMOylated proteins enriched by histidine affinity were separated by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by anti-HA immunoblotting to detect SAMHD1 and its modified forms. Upon expression of SUMO-2 and SUMO-3 proteins, a ~100 kDa band was detected, consistent with the expected size of SAMHD1 conjugated to a SUMO moiety (Figure 2A). This band was absent both in mock-transfected cells and cells expressing SUMO-1 (Figure 2A), although SAMHD1 was equally expressed in all samples (Figure 2C). Upon treatment with MG132, we observed a ladder of high molecular-weight (HMW) species of SAMHD1, reminiscent of conjugation of multiple SUMO moieties (Figure 2A), indicating that SUMO conjugation might play a role in SAMHD1 stability control.

We also performed the reverse experiment using the remaining aliquot. SAMHD1 and its post-translational derivatives were purified on HA-matrix beads, subject to SDS-PAGE electrophoresis and the SUMOylated fraction was visualized by immunoblotting with antibodies against SUMO-1 or SUMO-2/3. A faint band reactive to the anti-SUMO-1 antibody was visualized in untreated SUMO-1-expressing cells, while multiple bands accumulated upon inhibition of the proteasome (Figure 2B), likely reflecting the role of SUMO-1 as polySUMO chain terminator (31). Multiple HMW bands were readily observed in untreated SUMO-2- or SUMO-3-expressing cells likely because SAMHD1 possesses multiple SUMO conjugation sites and/or undergoes concomitantly other post-translational modifications such as phosphorylation (Figure 2B). Once more, SUMOylated SAMHD1 species accumulated upon proteasome inhibition (Figure 2B).

Our results confirm that SAMHD1 is modified by SUMO proteins, mainly SUMO-2/3 paralogues. The accumulation of SUMO-conjugated forms of SAMHD1 upon proteasome inhibition suggests that SUMOylation might be involved in the regulation of SAMHD1 turnover.

Lysine residues at position 469 and 622 in SAMHD1 are major SUMO acceptor sites

SAMHD1 was a hit in recent large scale proteomic studies aiming to characterize the cellular SUMOylome and Lysine (K) residues at position 469, 595 and 622 were identified as SUMO target sites (32-34). We compared the sequences of SAMHD1 isoforms from different species and found that K595 is conserved through evolution from zebrafish to humans, while the two other sites are found only in primates (Figure 3A and Supp. Figure 2). Next, we mutated the identified K residues of SAMHD1 to arginine (R) in order to preserve a basic character and tested their SUMOylation profile. Since several post-translational modifications such as ubiquitination and acetylation target K residues, we generated SAMHD1 variants where we mutated the acidic residue within the corresponding SUMO-consensus motifs (ϕ KxAc) which is required for the recruitment of the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 (35). Having shown SAMHD1 is preferentially modified by SUMO-2 and SUMO-3 that are highly similar we limited our further analysis to SUMO-2. We transfected 293T cells with plasmid encoding WT or mutant SAMHD1, His-SUMO-2 and Ubc9 and performed Ni-NTA experiments as described above. The 100 kDa mono-SUMOylated form was readily observed in untreated cells expressing WT, K469R, E471Q, K595 or E597Q SAMHD1 variants but was not detected when the K622 or D624 were mutated to R and N, respectively (Figure 3B and data not shown). As shown before, polySUMOylated forms accumulate in cells expressing WT SAMHD1 and treated with the proteasome inhibitor MG132. SUMO2-conjugated forms were also enriched in cells expressing the K595R, E595Q, K622R or D624N SAMHD1 mutant, but were virtually absent when K469 or E471 were mutated (Figure 3B). These results indicate that a SUMO moiety is bound at K622 at baseline, while K469 is targeted by polySUMOylation in response to proteasome inhibition. Mutation of K595 or E597 did not detectably alter the SUMO-conjugation profile of SAMHD1 indicating that this site has overall a minor contribution. To directly investigate whether SAMHD1 is modified by SUMO on additional residues, we mutated the identified SUMOylation sites in combination. Substitution of K469 and K622 (2K) or the corresponding acidic residues (2Ac) weakened SUMO conjugation to SAMHD1 in untreated cells and, even more markedly, upon inhibition of the proteasome (Figure 3C). Concomitant mutation of K595 (3K) or E597 (3Ac) virtually abolished SUMOylation (Figure 3C).

Altogether these results confirm that K469 and K622 are the major SUMO acceptor residues of SAMHD1, while K595 has a minor contribution to the overall SUMOylation of SAMHD1 that can be appreciated only upon mutation of the two other sites.

SUMOylation-deficient SAMHD1 mutants have WT antiviral activity

To assess whether SUMOylation influences the antiviral activity of SAMHD1, we stably expressed WT SAMHD1 or the SUMOylation-site mutants in the monocytic U937 cell line, which lacks expression of endogenous SAMHD1 (Figure 4A and 4B). To test the anti-HIV-1 activity of SAMHD1 variants, the resulting cell lines as well as parental U937 were differentiated into macrophage-like cells by PMA treatment, and next challenged with the VSVg/HIV-1-GFP virus. As previously demonstrated (4), expression of WT SAMHD1, but not the HD/AA or T592E mutant, rendered U937 cells resistant to HIV-1 infection (Figure 4C). Substitution of K469 and K622 to R, individually or in combination (2KR), did not significantly alter the anti-HIV-1 activity of SAMHD1 (Figure 4C). These results were recapitulated upon mutation of the adjacent acidic residues, which specifically impairs SUMOylation without affecting other post-translational modifications that target K residues (Ubiquitination, acetylation). We also assessed the antiviral activity of SUMOylation-defective SAMHD1 mutants in cycling U937 cells challenged with different doses of VSVg/HIV-1-GFP. Consistent with previous studies, dividing cells were permissive to HIV-1 regardless of the SAMHD1 variant expressed and the viral input (Figure 4D).

Previous studies showed that mutation of SAMHD1 K622 residue, which directly contacts DCAF1 N1092 residue, impairs Vpx-mediated degradation (Schwefel et al., 2014). Thus, we investigated the impact of this and other SUMOylation-deficient mutants on the infection of PMA-treated U937 by VSVg-pseudotyped HIV-2 virus, or its Vpx-defective version (HIV-2 Δ Vpx), harboring a GFP reporter gene (moi 0.1). As shown in Figure 4E, WT SAMHD1 reduced the susceptibility of U937 to HIV-2 Δ Vpx infection, while the HD/AA and T592E mutants did not. As observed in the case of HIV-1, all SUMOylation-defective SAMHD1 variants restrict HIV-2 Δ Vpx to the same extent as their WT counterpart (Figure 4E). Finally, we found that neither WT SAMHD1, nor any of the SUMOylation-defective mutants, including the K622R variant, affected the susceptibility of U937 cell to HIV-2 (Figure 4F).

In line with the infection experiments, we found that SUMO-defective mutants 2KR and 2Ac still interact with Vpx and DCAF1 and are still sensitive to Vpx-mediated degradation (Supp. Figure 1). Altogether these data indicate that impairing SUMO-conjugation to K469 and/or K622 does not alter the antiviral activity of SAMHD1.

SUMOylation-deficient SAMHD1 mutants have WT dNTPase activity and localization

Several converging observations link the antiviral and dNTPase functions of SAMHD1. Thus, we investigated whether SUMOylation of SAMHD1 influences its dNTPase activity. To this aim, we quantified the levels of dATP and dGTP (representative of the four dNTPs) in PMA-treated U937 cells expressing WT, T592E, HD/AA or SUMOylation-defective SAMHD1 variants. Parental U937 and THP1 cells were also included as control for the absence or the presence of endogenous SAMHD1, respectively. As expected, the dNTP concentration of U937 cells expressing WT SAMHD1 was significantly lower than of the parental cell line and comparable to that of differentiated THP1

cells (Figure 5A). In agreement with previous reports (9, 10, 15, 18), expression of SAMHD1 HD/AA mutant did not alter the dNTP levels of U937 cells, while SAMHD1 T592E mutant was as potent as its WT counterpart in depleting cellular dNTPs (Figure 5A). Similar levels of dNTPs were measured in U937 cells expressing the SUMOylation-site mutants, indicating that their dNTPase activity is intact (Figure 5A).

Finally, we studied the relative contribution of each SUMOylation site to the localization of SAMHD1, we analyzed the distribution of most of the SUMOylation-deficient mutants in PMA-treated U937 cells. As shown in Figure 5B, SUMOylation-deficient SAMHD1 mutants accumulate in the nucleus like their WT counterpart, indicating that SUMO conjugation does not influence the subcellular distribution of the protein.

DISCUSSION

SAMHD1 plays an important role as a regulator of intracellular dNTPs levels. It is well established that SAMHD1 counteract HIV-1 but not Vpx-expressing retroviruses in non-dividing myeloid cells. However, the involvement of its dNTPase activity in antiviral defenses is still controversial and several lines of evidence suggest that other features of SAMHD1 have to be considered.

Here we showed for the first time that SAMHD1 is modified by SUMO proteins, mainly by SUMO-2 paralogue. Conjugated forms seems to be enriched under proteasome inhibition, suggesting a degradation pathway. Beginning with *in silico* analysis we identified and confirmed by biochemical experiments three major SUMOylation sites. Lysine residue K469 is located in HD domain, K595 is adjacent to the phosphorytable residue T592 and K622 lies in the C-terminal region of SAMHD1, near the Vpx-binding site.

Despite the expected role of SUMOylation in the regulation of SAMHD1, our result show that antiviral and dNTPase activities of SAMHD1 stay unchanged when two of the major SUMO-sites are mutated (2KR, 2Ac). The first hypothesis is that SUMOylation is not involved in the modulation of these activities. The second is that residue K595 plays a role, even if the biochemical experiments highlight its minor contribution. Knowing that K595 is adjacent to T592 (targeted by phosphorylation in cycling cells), it could represent a major determinant involved in the mechanism of restriction. It could be interesting to investigate this hypothesis.

We showed that, despite K622 being located near the tripartite motif involved in Vpx and DCAF1 interaction, mutation of this residue does not impair the recruitment of Vpx and DCAF1. Infection experiments with Vpx-expressing HIV-2 virus indicated that SAMHD1 K622R is still degraded. Considering that conjugation leads to bulky retention of SUMO on SAMHD1, we could hypothesize that SUMOylation on K622 impairs the recruitment of Vpx and ubiquitin E3 ligase complex. As our experiments focus on the loss of SUMOylation it is difficult to forecast if this hypothesis is plausible.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Inhibition of SUMOylation by ginkgolic acid or anacardic acid renders THP1 cells less resistant to HIV-1 and HIV-2ΔVpx. As represented in **(A)** THP1 cells were differentiated by PMA treatment (100 ng/mL). Twenty four hours later, PMA was removed and cells were treated or not with IFN- α (500 U/mL). Twenty four hours later, cells were treated with Ginkgolic acid (GA, 50 μ M, 2h) or Anacardic acid (AA, 50 μ M, 2h) or a combination of IFN α -GA or IFN α -AA. Cells were then challenged with HIV-1 **(B)** , HIV-2 **(D)** or HIV-2 Δ Vpx **(E)** viruses harboring the GFP reporter gene and pseudotyped with the VSVg envelope glycoproteins. Undifferentiated THP1 cells were also infected with HIV-1 **(C)**. Forty-eight hours post-infection, cells were harvested and fixed with 4% PFA and the percentage of infected (GFP-positive) cells was measured by flow cytometry. GA, AA and IFN- α efficacies were verified by Western blotting. Expression of endogenous proteins modified by SUMO-1 was revealed from a whole cell lysates and with indicated antibody **(F)**. Differentiated THP-1 cells were fixed and next incubated with anti-SAMHD1 and anti-SUMO-2/3 antibodies and processed for Proximity Ligation Assay (PLA). SAMHD1 localisation was probed using an Alexa₄₈₈-coupled secondary antibody (IF panels, green). Nuclei were stained with DAPI. Images were acquired with a laser-scanning confocal microscope (LSM510 Meta; Carl Zeiss) equipped with an Axiovert 200 M inverted microscope, using a Plan Apo 63/1.4-N oil immersion objective. **(G)**. Data represent one experiment from four independent experiments performed in three biological replicates. Data are expressed as the median \pm sem, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, using two-way ANOVA with the appropriate post-test for multiple comparisons **(B, C, D, E)**.

Figure 2. SAMHD1 is SUMOylated and SUMO-conjugated forms accumulated upon inhibition of the proteasome. HEK 293T cells were transfected with plasmids encoding HA-SAMHD1 and His-tagged SUMO-1 (His-S1), SUMO-2 (His-S2), SUMO-3 (His-S3) or the control empty plasmid (ctr). Twenty-four hours after transfection, cells were treated or not with MG132, a proteasome inhibitor (3 μ M, overnight). Next, cells were split in two equal aliquots, one of which was lysed in strong denaturing condition (guanidium HCl 6M, imidazole 10mM) to inhibit SUMO proteases. SUMOylated proteins were enriched on a NiNTA column **(A)**. The second aliquot was incubated in denaturing buffer containing 1% SDS and sodium deoxycholate, and SAMHD1 was immunoprecipitated on HA-matrix beads **(B)**. Following elution, proteins were separated on a 4-15% SDS-PAGE gel and visualized by Western blotting using the indicated antibodies. The expression levels of over-expressed proteins were probed in the whole cell lysate (WCL) **(C)**.

Figure 3. SAMHD1 K469 and K622 are major SUMO conjugation sites. Schematic representation of SAMHD1 indicating the nuclear localization signal (NLS), Sterile Alpha Motif (SAM), Histidine/Aspartate domain (HD), phosphorylatable T592 and Vpx-binding site. Numbering corresponds to the human isoform. The insert shows the amino acid sequence alignment of candidate SUMOylation motifs of SAMHD1 isoforms from human, macaque, mouse and zebrafish **(A)**. HEK 293T cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged SAMHD1 WT or mutants, Ubc9 and His-tagged SUMO-2. Cells were processed as in Figure 2 **(B and C)**. WCL: whole cell lysate.

Figure 4. The antiviral activity of SUMOylation-site mutants is similar to SAMHD1 WT. WT or SUMOylation-defective SAMHD1 mutants were stably expressed in U937. Cells were differentiated by PMA treatment (100ng/mL, 2 days) and used according to the experimental outline **(A)**. The expression of WT or mutants was confirmed by Western blotting. Intensity of the signal was measured by densitometry with ImageJ **(B)**. Differentiated cells were infected with VSVg-pseudotyped HIV-1 **(C)**, HIV2 Δ Vpx **(E)** or HIV-2 **(F)** viruses encoding the GFP reporter gene. Undifferentiated U937 cells were also infected with HIV-1 **(D)**. Forty-eight hours post infection, cells were harvested and fixed with 4% PFA and the percentage of infected (GFP-positive) cells was measured by flow cytometry. Negative control: SAMHD1 HD/AA. Error bars represent the median \pm sem for n=3 independent experiments performed in three biological replicates.

Figure 5. SUMOylation-defective SAMHD1 mutants have WT localization and dNTPase activity. U937 cells stably expressing SAMHD1 WT or SUMOylation-defective mutants were differentiated by PMA treatment (100ng/mL, 2 days). First, and after fixation (4% PFA), the localization of SAMHD1 protein was assessed by immunofluorescence using an anti-HA followed by Alexa₄₈₈-coupled secondary antibody. Nuclei were stained with DAPI. Images were acquired with a laser-scanning confocal microscope (LSM510 Meta; Carl Zeiss) equipped with an Axiovert 200 M inverted microscope, using a Plan Apo 63/1.4-N oil immersion objective **(A)**. Second, cells were harvested in ice-cold 65% methanol and lysed by heating (95°C). Cellular dATP and dGTP concentrations were measured as previously described (11). Graphs show dNTP levels normalized based on expression levels of SAMHD1 variants quantified as in Figure 4B. Bars show the mean \pm std of three independent measurements performed in two biological replicates. ****: p<0.0001 **(B)**.

Supplementary Figure 1. SUMOylation-deficient SAMHD1 variants interact with and are degraded by Vpx. HEK 293T cells stably expressing Flag-tagged Vpx were transfected with plasmids encoding HA-SAMHD1 WT, mutants or the control empty plasmid (ctr). Cell lysates were incubated with the Pierce™ HA-Tag IP/Co-IP Kit and eluted proteins were analyzed as in Figure 2 **(A)**. U937 stably expressing WT SAMHD1 or mutants were differentiated by PMA-treatment (100ng/mL, 5 days) and infected with VSVg-pseudotyped HIV-2 or HIV2ΔVpx viruses encoding the GFP reporter gene. The first fraction of cells was harvested 8h post-infection, subjected to intracellular staining with an anti-HA Dylight 650 antibody and analyzed by flow cytometry. Bars show the mean \pm std of three independent experiments. ****: $p < 0.0001$ **(B)**. The second fraction was harvested 48h post-infection and lysed in Laemmli buffer by boiling. Expression levels of SAMHD1 proteins was visualized by Western blotting using indicated antibodies. NI: non infected; 2: HIV-2; Δ: HIV-2ΔVpx. Intensity of the signal was measured by densitometry with ImageJ **(C)**.

Supplementary Figure 2. Multi-alignment of SAMHD1 sequence from different species. Multi-alignment of SAMHD1 protein from human, different simian, murine and amphibian sequences was obtained with MultiAlin software. Red boxes indicate the three major SUMO-site, black arrow point at the phosphorytable residue T592.

References

1. Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N. R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., König, R., Fackler, O. T., and Keppler, O. T. (2012) SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 18, 1682–9
2. Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., Benkirane, M., Schawartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012) SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells. *Retrovirology.* 9, 87
3. 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, 658–61
4. Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, 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, 654–7
5. 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
6. Ji, X., Tang, C., Zhao, Q. Q., Wang, W., and Xiong, Y. (2014) Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4305–E4314
7. 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, 1304–9
8. Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., Reichard, P., and Bianchi, V. (2013) The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14272–14277
9. Yan, J., Kaur, S., DeLucia, M., Hao, C., Mehrens, J., Wang, C., Golczak, M., Palczewski, K., Gronenborn, A. M., Ahn, J., and Skowronski, S. (2013) Tetramerization of SAMHD1 is required for biological activity and inhibition of HIV infection. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M112.443796
10. Arnold, L. H., Groom, H. C. T., Kunzelmann, S., Schwefel, D., Caswell, S. J., Ordonez, P., Mann, M. C., Rueschenbaum, S., Goldstone, D. C., Pennell, S., Howell, S. A., Stoye, J. P., Webb, M., Taylor, I. A., and Bishop, K. N. (2015) Phospho-dependent Regulation of SAMHD1 Oligomerisation Couples Catalysis and Restriction. *PLoS Pathog.* 11, 1–30
11. 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, 223–8
12. Lenzi, G. M., Domaoal, R. A., Kim, D., Schinazi, R. F., and Kim, B. (2014) Kinetic variations between reverse transcriptases of viral protein X coding and noncoding lentiviruses. *Retrovirology.* 11, 111

13. Antonucci, J. M., St. Gelais, C., and Wu, L. (2017) The Dynamic Interplay between HIV-1, SAMHD1, and the Innate Antiviral Response. *Front. Immunol.* 8, 1541
14. Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.-Y., Seo, D., Kim, J., White, T. E., Brandariz-Nuñez, 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, 936–41
15. Bhattacharya, A., Wang, Z., White, T., Buffone, C., Nguyen, L. A., Shepard, C. N., Kim, B., Demeler, B., Diaz-Griffero, F., and Ivanov, D. N. (2016) Effects of T592 phosphomimetic mutations on tetramer stability and dNTPase activity of SAMHD1 can not explain the retroviral restriction defect. *Sci. Rep.* 6, 31353
16. Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J. C., White, T. E., Nguyen, L., Bhattacharya, A., Wang, Z., Demeler, B., Amie, S., Knowlton, C., Kim, B., Ivanov, D. N., and Diaz-Griffero, F. (2013) Contribution of oligomerization to the anti-HIV-1 properties of SAMHD1. *Retrovirology.* 10, 131
17. Welbourn, S., Dutta, S. M., Semmes, O. J., and Strebel, K. (2013) Restriction of Virus Infection but Not Catalytic dNTPase Activity Is Regulated by Phosphorylation of SAMHD1. *J. Virol.* 87, 11516–11524
18. White, T. E. E., Brandariz-Nunez, A., Valle-Casuso, J. C., Amie, S., Nguyen, L. A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013) The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe.* 13, 441–451
19. 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. *EMBO J.* 36, 604–616
20. St. Gelais, C., de Silva, S., Hach, J. C., White, T. E., Diaz-Griffero, F., Yount, J. S., and Wu, L. L. (2014) Identification of Cellular Proteins Interacting with the Retroviral Restriction Factor SAMHD1. *J. Virol.* 88, 5834–5844
21. Badia, R., Pujantell, M., Torres-Torronteras, J., Menéndez-Arias, L., Martí, R., Ruza, A., Pauls, E., Clotet, B., Ballana, E., Esté, J. A., and Riveira-Muñoz, E. (2017) SAMHD1 is active in cycling cells permissive to HIV-1 infection. *Antiviral Res.* 142, 123–135
22. Békés, M. & Drag, M. Trojan horse strategies used by pathogens to influence the small ubiquitin-like modifier (SUMO) system of host eukaryotic cells. *J. Innate Immun.* 4, 159–67 (2012).
23. Everett, R. D., Boutell, C. & Hale, B. G. Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 400–11 (2013).
24. Flotho, A. & Melchior, F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 357–85 (2013).
25. Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. & Dikic, I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.* 281, 16117–27 (2006).
26. Hannoun, Z., Maarifi, G. & Chelbi-Alix, M. K. The implication of SUMO in intrinsic and innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 29, 3–16 (2016).
27. Sahin, U. et al. Interferon controls SUMO availability via the Lin28 and let-7 axis to impede virus replication. *Nat. Commun.* 5, 4187 (2014).
28. Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K.-I. ichi, Sodeoka, M.,

- Yoshida, M., Fukuda I, Ito A, Hirai G, Nishimura S, Kawasaki H, Saitoh H, Kimura K, Sodeoka M, Y. M., Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K.-I. ichi, Sodeoka, M., and Yoshida, M. (2009) Ginkgolic Acid Inhibits Protein SUMOylation by Blocking Formation of the E1-SUMO Intermediate. *Chem. Biol.* 16, 133–140
29. Bagchi, S., Fredriksson, R. & Wallén-Mackenzie, Å. In Situ Proximity Ligation Assay (PLA). *Methods Mol. Biol.* 1318, 149–59 (2015).
30. Bailey, D. & O'Hare, P. Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem. J.* 392, 271–281 (2005).
31. Tatham, M. H. et al. Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 Are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, 35368–35374 (2001).
32. Tammsalu, T. et al. Proteome-wide identification of SUMO modification sites by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 10, 1374–1388 (2015).
33. Hendriks, I. A. & Vertegaal, A. C. O. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016 (2016). doi:10.1038/nrm.2016.81
34. Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P. & Ribet, D. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 12432–7 (2014).
35. Rodriguez, M. S., Dargemont, C. & Hay, R. T. SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 12654–12659 (2001).
36. Griffin SD, Allen JF, Lever AM. The major human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) packaging signal is present on all HIV-2 RNA species: cotranslational RNA encapsidation and limitation of Gag protein confer specificity. *J Virol.* Dec;75(24):12058-69. (2001)
37. Impens F, Radoshevich L, Cossart P, Ribet D. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Aug 26;111(34):12432-7.

Martinat et al,

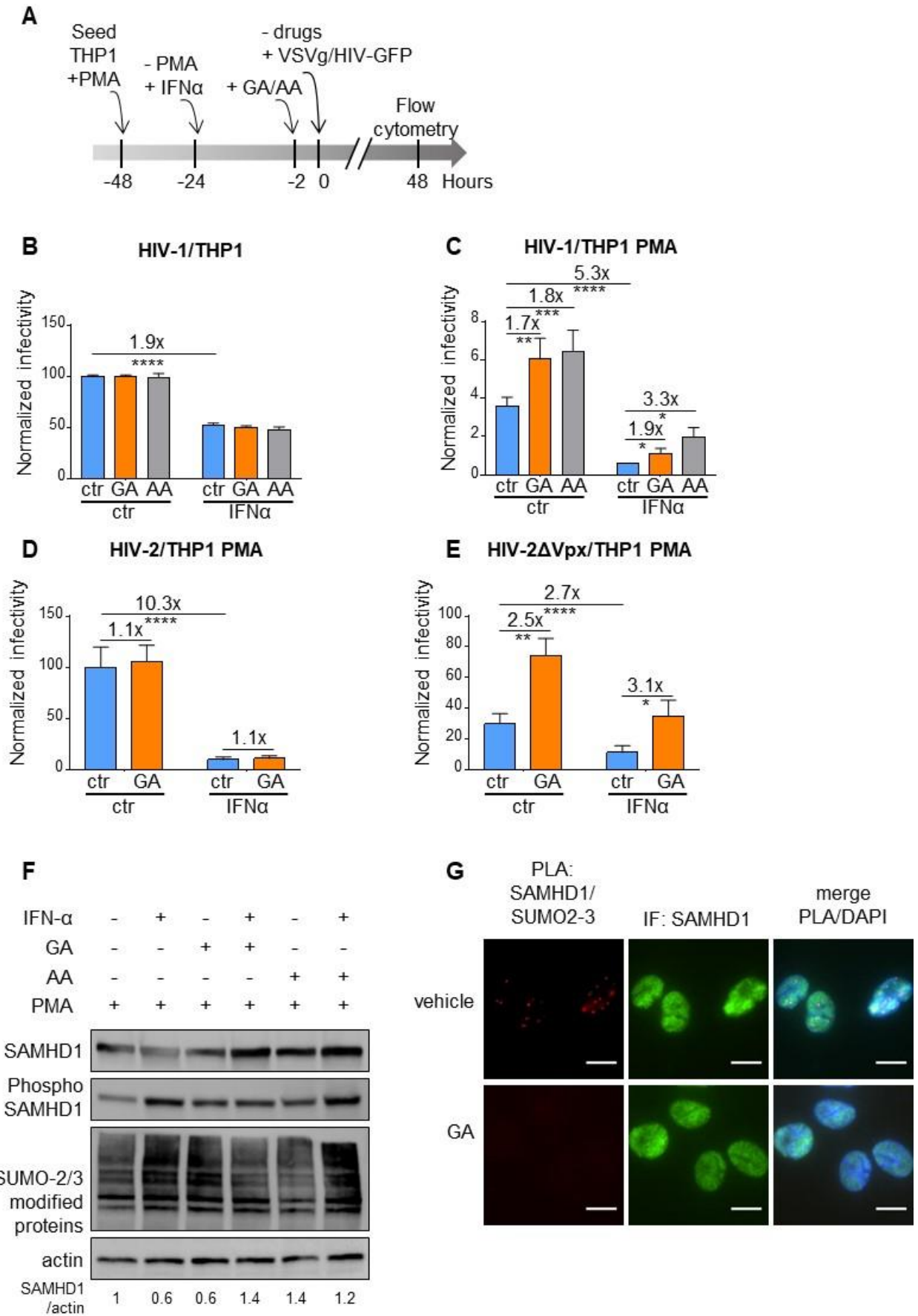


Figure 1

Martinat et al,

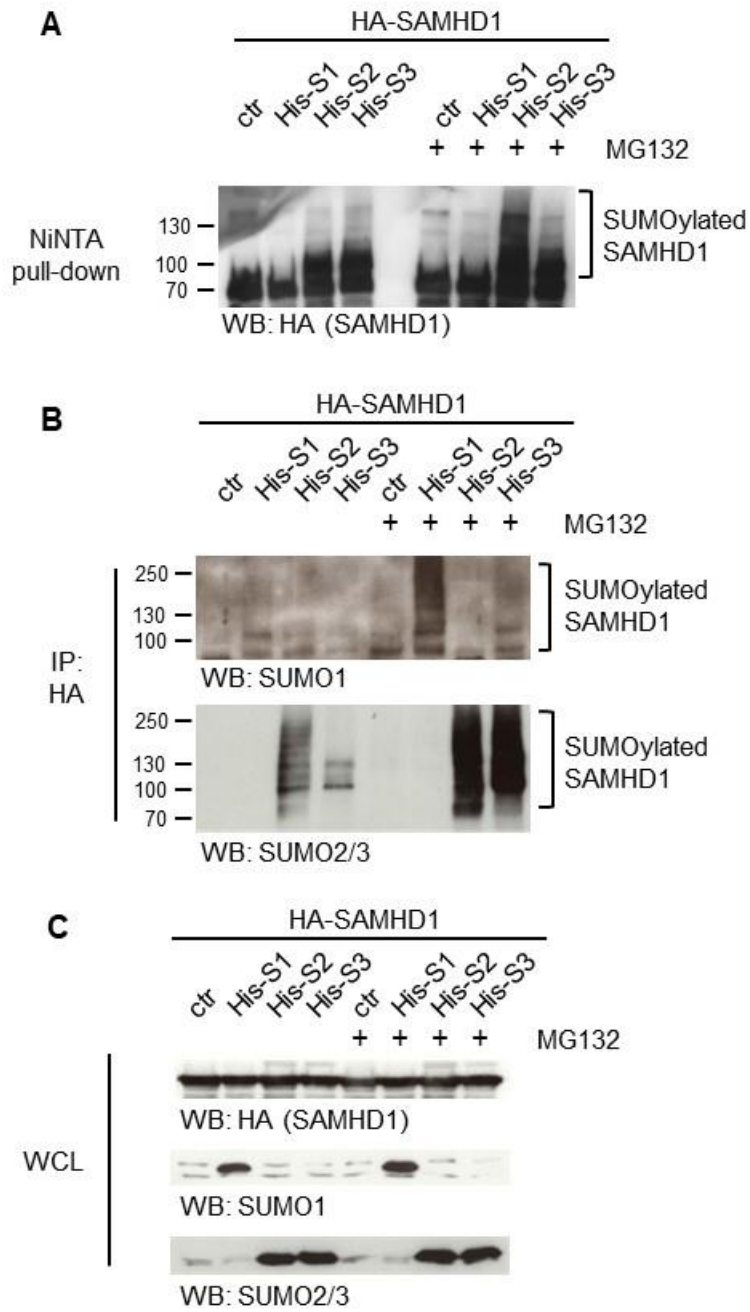


Figure 2

Martinat et al,

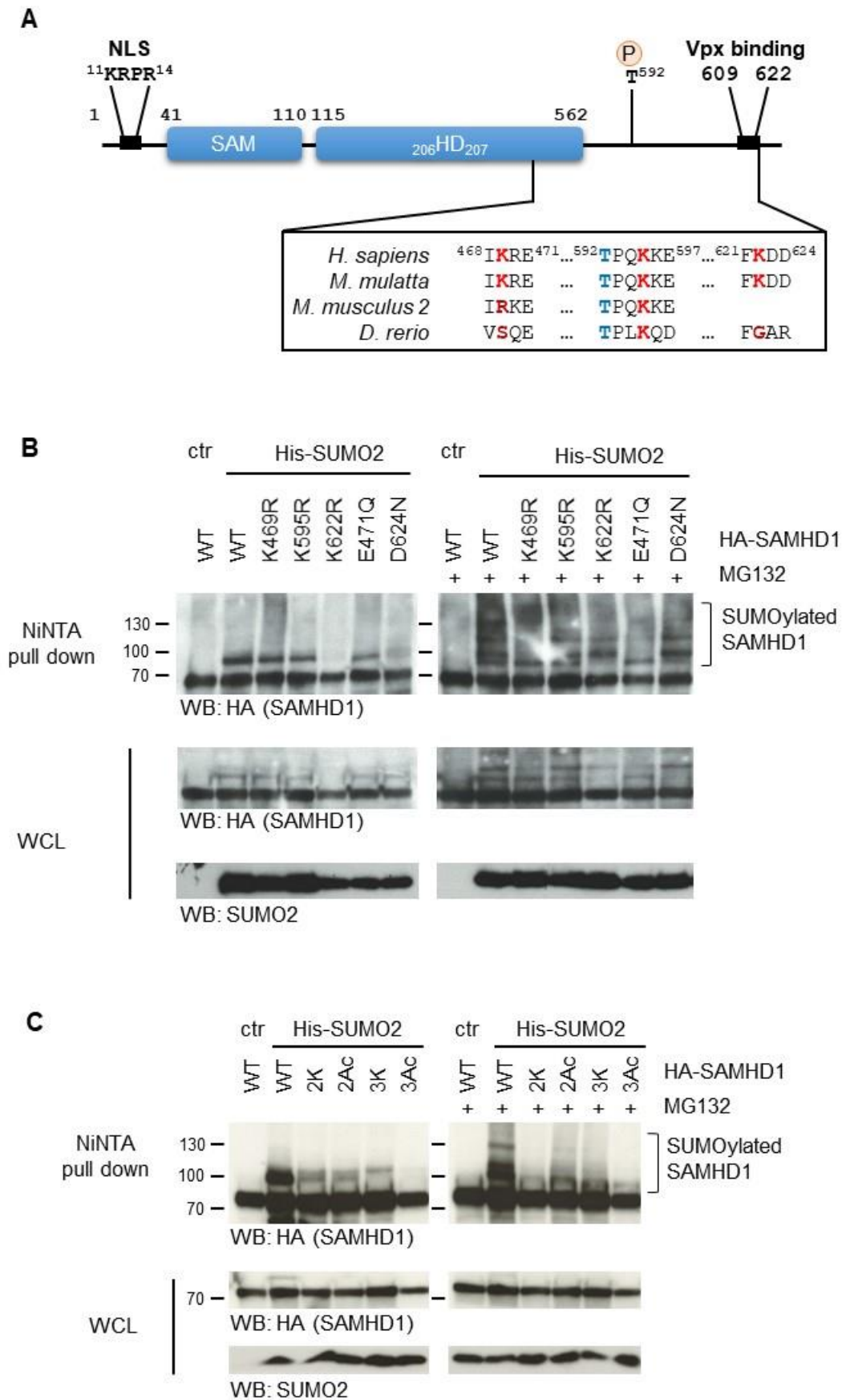


Figure 3

Martinat et al,

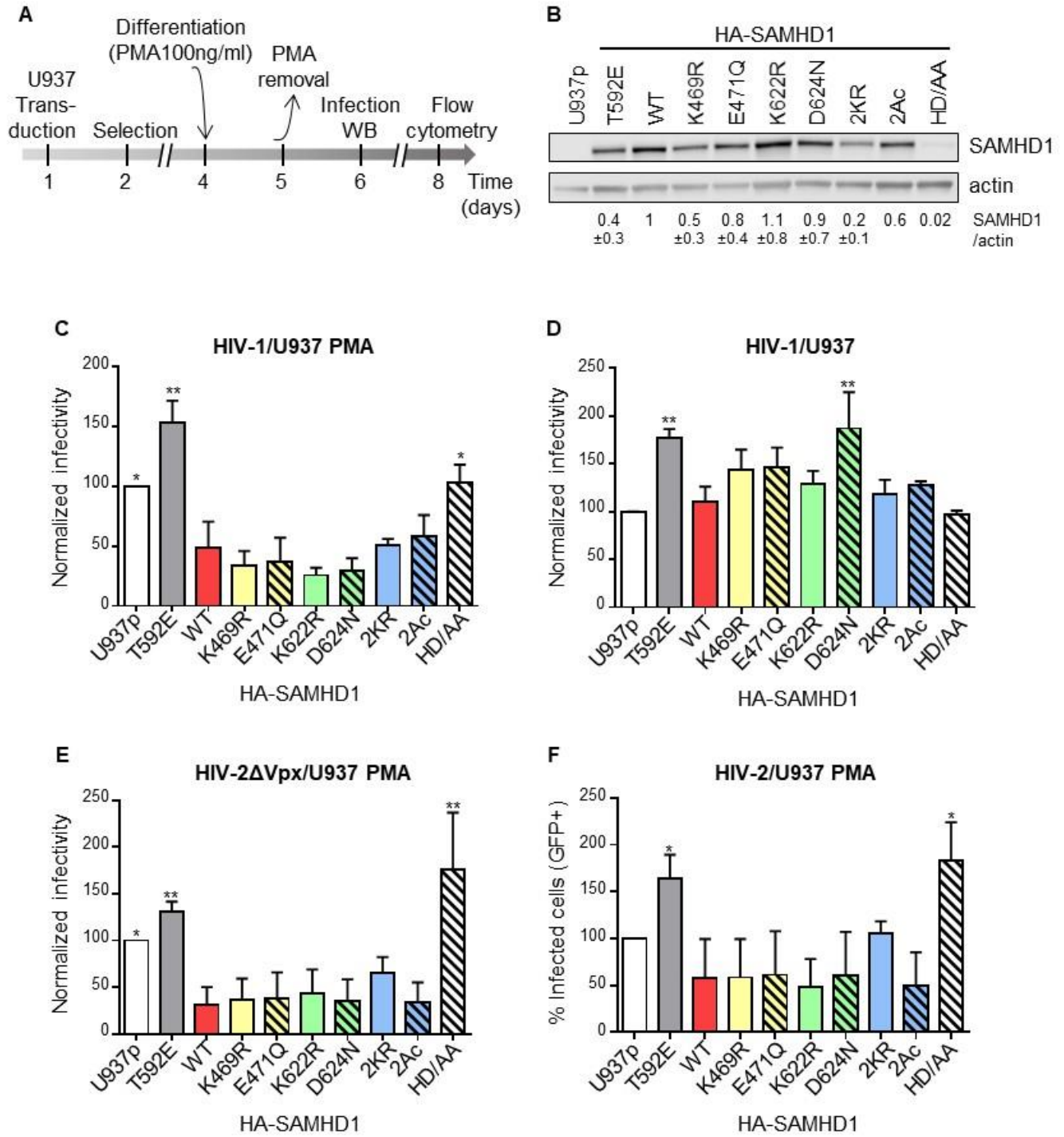


Figure 4

Martinat et al,

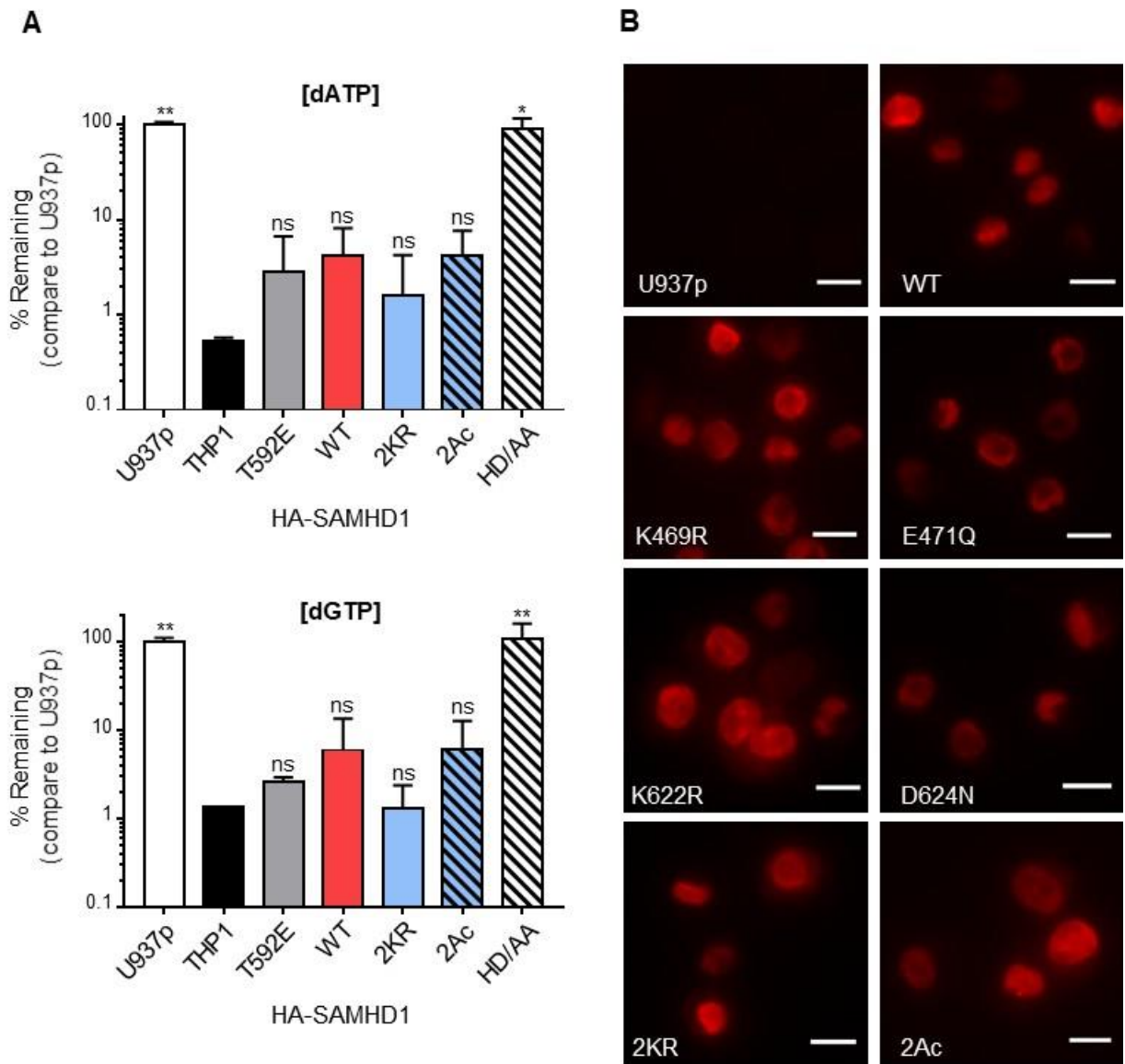
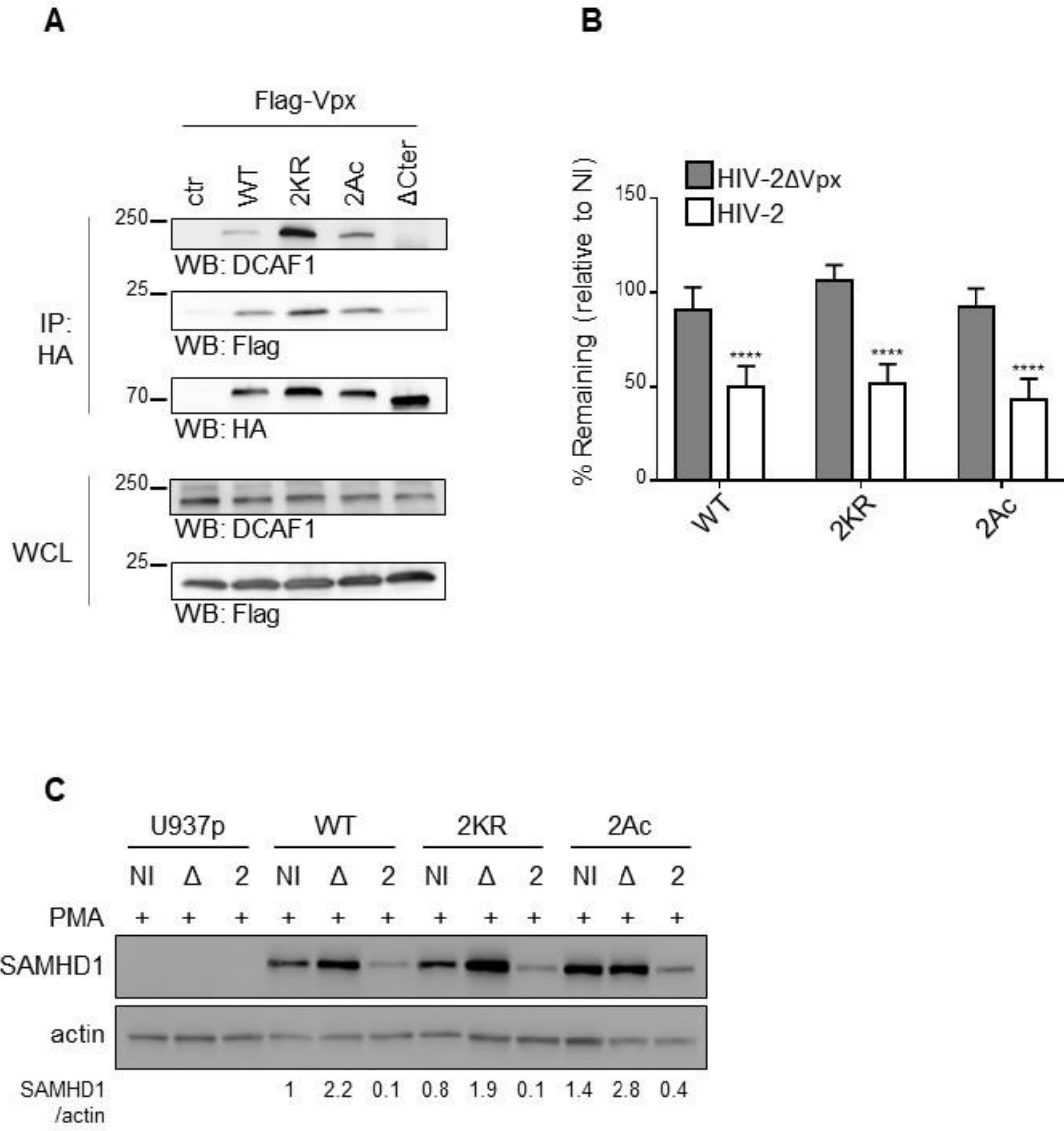


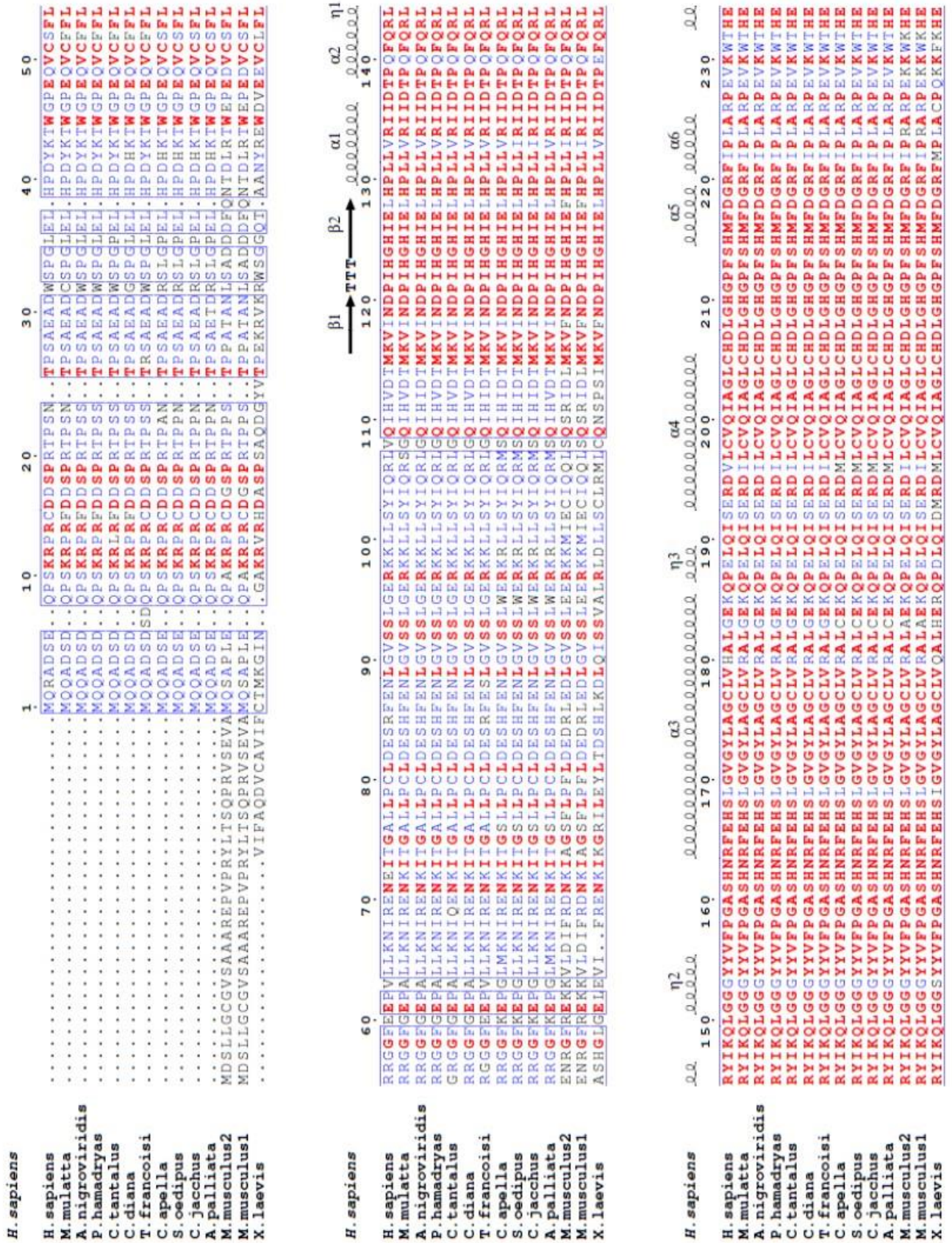
Figure 5

Martinat et al,



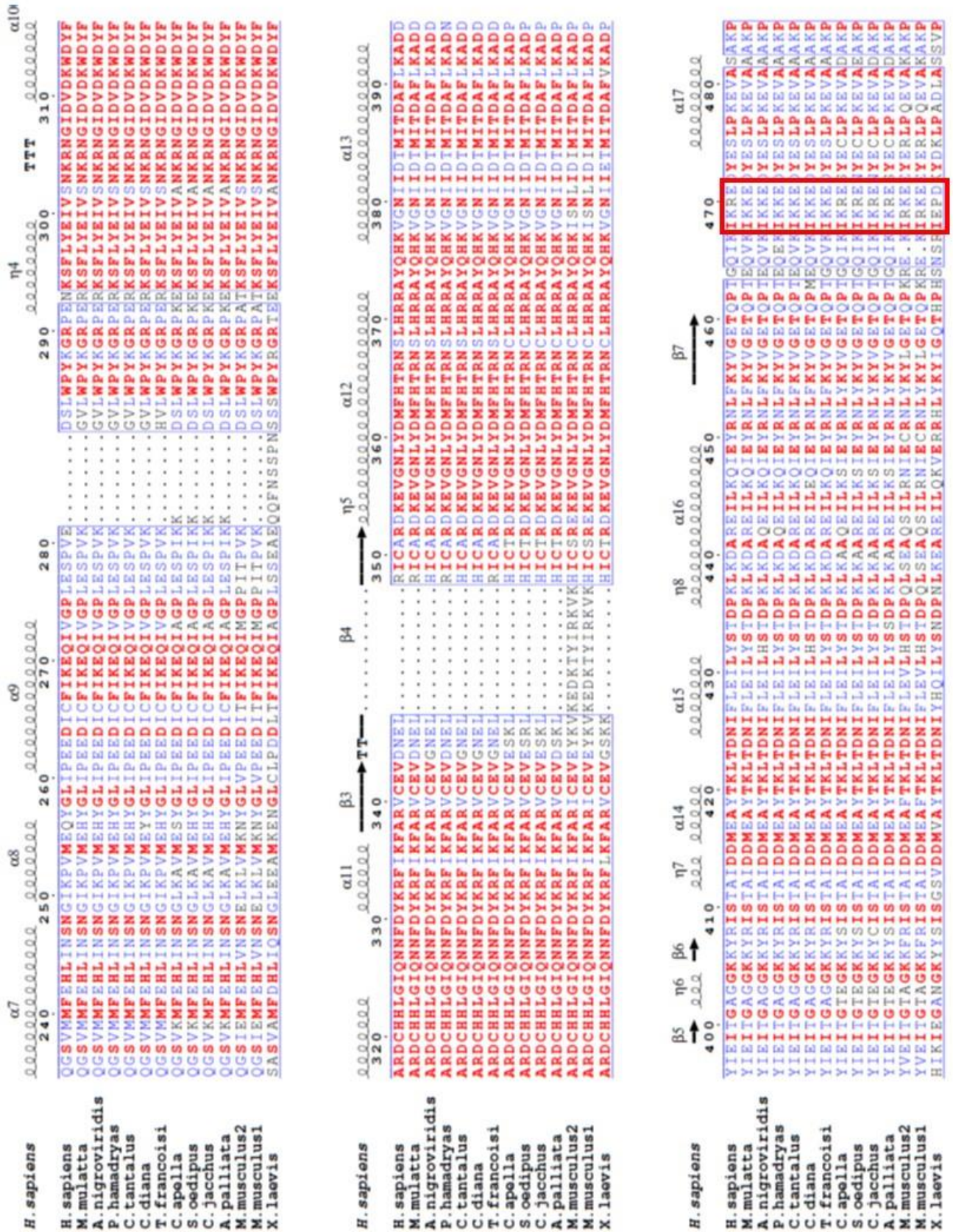
Supplementary Figure 1

Martinat et al,



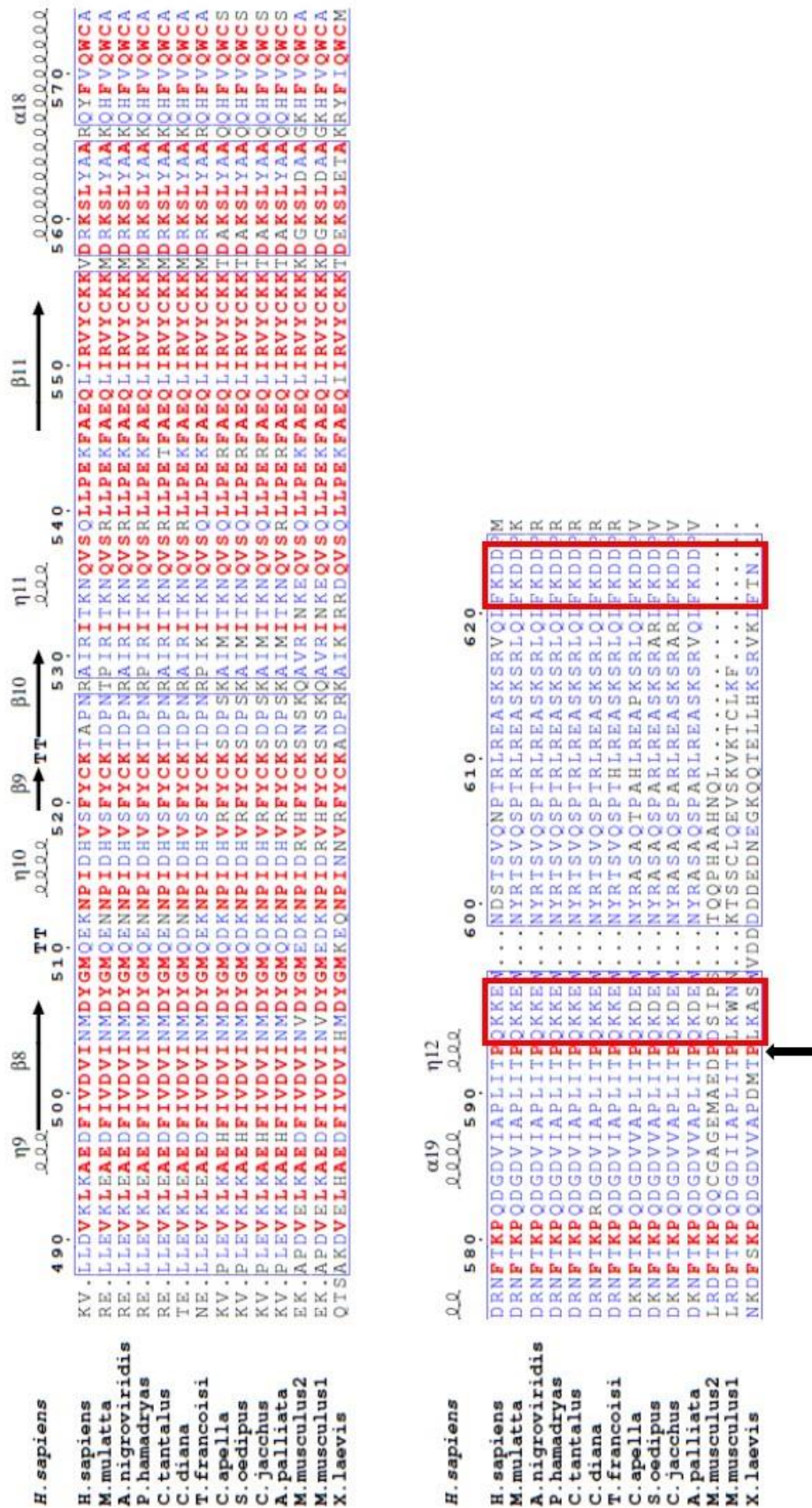
Supplementary Figure 2

Martinat et al,



Supplementary Figure 2

Martinat et al,



Supplementary Figure 2

Deuxième partie : Etude de la SUMOylation du résidu K595 de SAMHD1.

1/ Introduction

Nous avons montré précédemment que SAMHD1 possède trois sites majeurs ciblés par la SUMOylation : K469, K595 et K622. Les résidus K469 et K622 ont fait l'objet d'une étude de caractérisation fonctionnelle (présentée ci-dessus sous forme d'article). Les résultats de biochimie présentés dans cette étude indiquent que la mutation du résidu K595 n'influence pas la SUMOylation de SAMHD1 alors que le double mutant K469R/K622R n'est quasiment plus SUMOylé. Ces résultats suggèrent que les sites majeurs de SUMOylation sont K469 et K622 et que le résidu K595 représente un site mineur. Pourtant, la mutation simultanée des trois résidus Lysine abolit complètement la SUMOylation de SAMHD1 suggérant alors que le résidu K595 contribue à un mécanisme de régulation de SAMHD1.

L'objectif de cette deuxième étude est de déterminer le rôle du résidu K595 dans la SUMOylation de SAMHD1 et par conséquent dans la régulation de ses activités. Dans un premier temps, il s'agit d'évaluer l'effet du triple mutant de SAMHD1 sur la restriction de l'infection par le VIH-1. Dans un deuxième temps, nous nous intéressons au lien possible entre la SUMOylation et la phosphorylation de SAMHD1. En effet, le résidu K595 est adjacent au résidu T592 ciblé par la phosphorylation dans les cellules cyclantes, potentiellement responsable de la régulation de SAMHD1 dans ces cellules.

2/ L'inhibition de la SUMOylation de SAMHD1 sur le résidu K595 est responsable de la perte de l'activité anti-VIH-1

Pour déterminer si la conjugaison des protéines SUMO influence l'activité de restriction de SAMHD1, nous avons procédé comme décrit précédemment : nous avons utilisé des cellules U937 exprimant de manière stable la protéine SAMHD1 sauvage (WT) ou les mutants de perte de SUMOylation. Des cellules U937 exprimant le mutant phospho-mimétique T592E ont été incluses à l'expérience comme contrôle négatif, tout comme le mutant Q594N faisant partie du site de SUMOylation et étant adjacent au résidu phosphorylable. Les cellules différenciées à la PMA ont été infectées avec des VIH-1, VIH-2ΔVpx et VIH-2 pseudo-typés avec l'enveloppe du VSV et exprimant un gène rapporteur GFP. Le nombre de cellules infectées (GFP+) a été déterminé par cytométrie de flux (Figure 23A). L'expression de SAMHD1 WT dans les U937 a été vérifiée par Western blot : les mutants SAMHD1 Q594N, K595R et 3Ac semblent être moins exprimés que la protéine sauvage alors que le mutant E597Q est légèrement plus exprimé (Figure 23B).

Comme attendu, l'expression de SAMHD1 WT rend les U937 résistantes à l'infection par le VIH-1 alors que le mutant T592E a l'effet opposé et rend les cellules susceptibles à l'infection (Figure 23C). La mutation seule du résidu K595 en arginine (R) ou combinée au mutant 2KR (K469R/K622R) empêche les cellules de restreindre le VIH-1. Ce résultat est retrouvé avec la mutation de l'acide aminé acide du site de SUMOylation, E597 en glutamine (Q), seule ou combinée au mutant 2Ac (E471Q/D624N), mais pas avec le mutant Q594N. Enfin, ce phénotype est identique à celui observé avec le mutant qui mime la phosphorylation T592E.

Ce résultat indique que la perte de la SUMOylation de SAMHD1 due à la mutation du résidu K595 entraîne une perte d'activité antivirale.

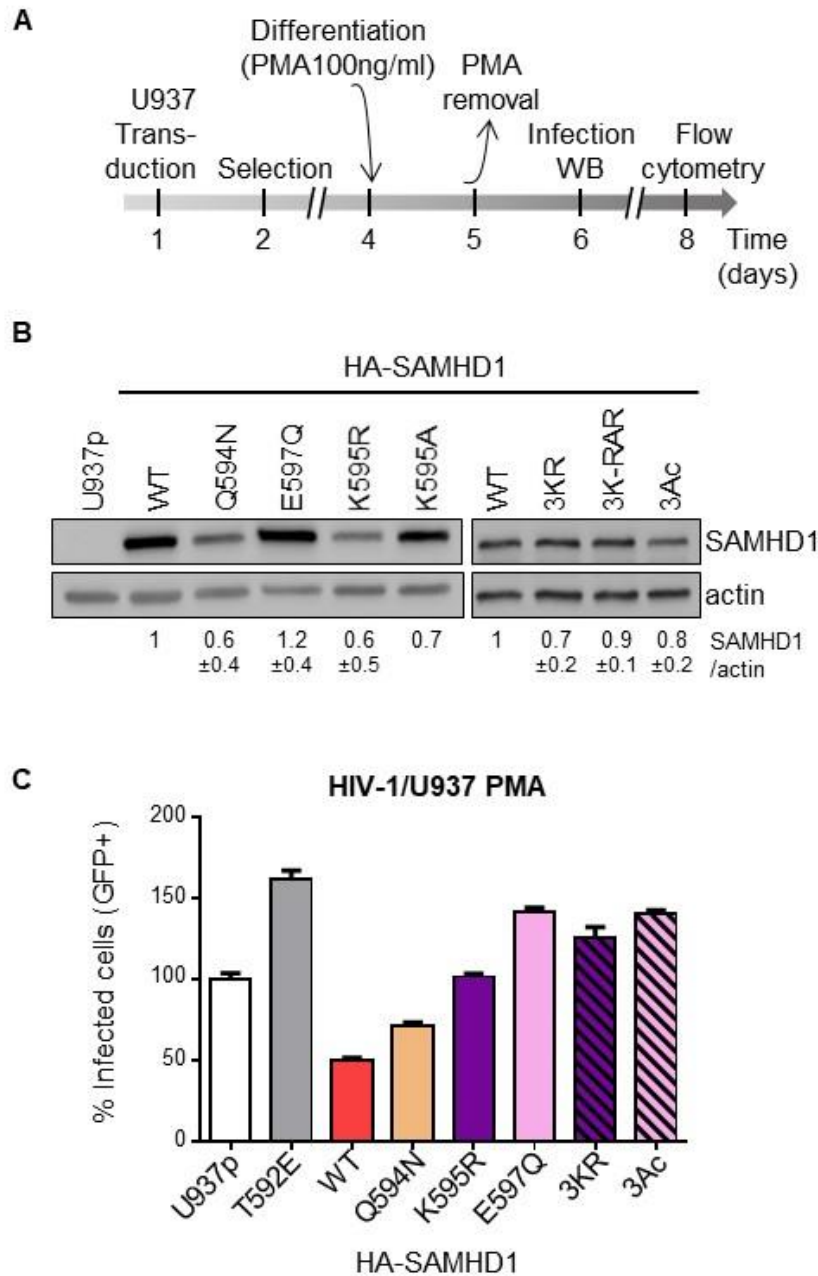


Figure 23. L'inhibition de la SUMOylation de SAMHD1 rend les cellules permissives à l'infection par le VIH-1.

Les U937 exprimant de manière stable SAMHD1 WT ou les mutants de perte de SUMOylation ont été différenciés à la PMA (100ng/mL, 2 jours) et utilisées comme l'indique la procédure expérimentale en **(A)**. L'expression de SAMHD1 WT et des mutants a été confirmée par Western blot. L'intensité du signal a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ **(B)**. Les cellules différenciées ont été infectées avec un VIH-1 pseudotypé avec l'enveloppe du VSV-G et exprimant le gène rapporteur GFP. Après 48h d'infection, les cellules ont été fixées en PFA 4% et le pourcentage de cellules infectées (GFP+) a été mesuré par cytométrie de flux **(C)**. Contrôle négatif : SAMHD1 HD/AA. Les barres d'erreur représentent la moyenne \pm sem pour n=3 expériences indépendantes réalisées en trois réplicas.

3/ L'inhibition de la SUMOylation de SAMHD1 sur le résidu K595 n'influence pas l'activité dNTPase

Etant donné que l'activité enzymatique principale de SAMHD1 est considérée comme étant à l'origine de son activité antivirale, nous avons voulu savoir si la perte de SUMOylation de SAMHD1 pouvait réguler son activité dNTPase. En collaboration avec l'équipe du Pr Kim Baek (Atlanta USA), nous avons quantifié les niveaux cellulaires de dNTPs dans les cellules U937 différenciées exprimant ou non les mutants de SAMHD1 ainsi que dans des THP1 (qui nous informent de l'activité de la protéine endogène).

Comme le montre la Figure 24, les concentrations en dATP et dGTP des cellules U937 exprimant SAMHD1 WT sont inférieures à celle des cellules parentales (n'exprimant pas SAMHD1). Ce résultat met en évidence l'activité enzymatique dNTPase de SAMHD1 déjà décrite. De manière surprenante, tous les mutants de SAMHD1 utilisés dans cette expérience réduisent les niveaux de dATP et dGTP dans les mêmes proportions que SAMHD1 WT, excepté le mutant du site catalytique HD/AA (perte d'activité enzymatique).

Ces résultats sont inédits et suggèrent fortement que la perte de SUMOylation de SAMHD1, qui semble inhiber son activité antivirale (Figure 23), n'a aucun effet sur son activité enzymatique dNTPase.

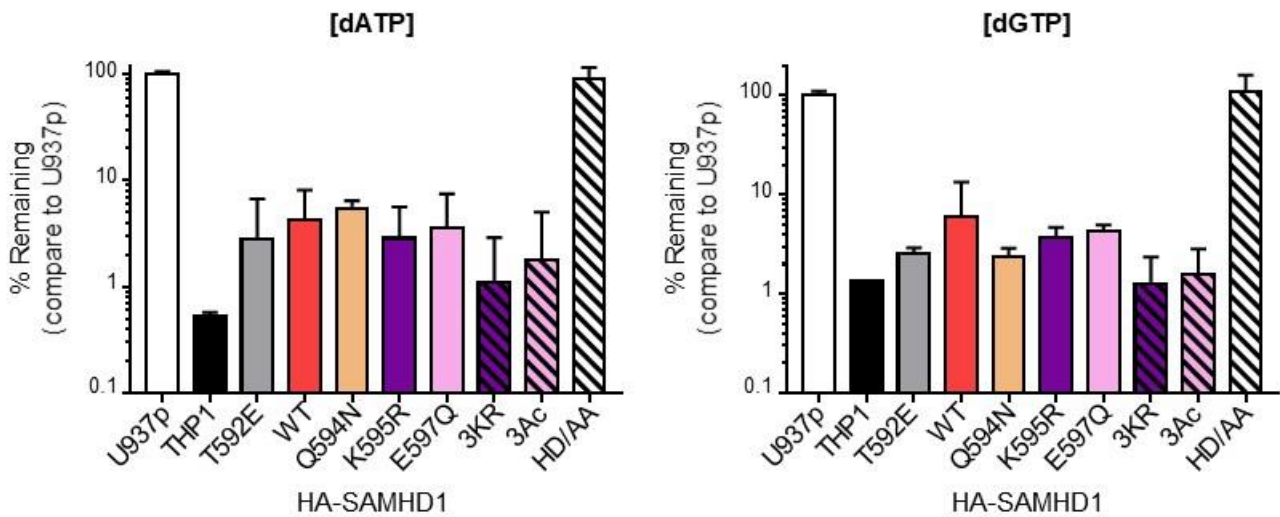


Figure 24. Les mutants de perte de SUMOylation qui ne peuvent plus contre le virus maintiennent une activité dNTPase fonctionnelle.

Les U937 exprimant de manière stable SAMHD1 WT ou les mutants de perte de SUMOylation ont été différenciées à la PMA (100ng/mL, 2 jours), récupérées dans du méthanol 65% froid et lysées à 95°C. Les concentrations en dATP et dGTP dans ces cellules ont été mesurées comme décrit précédemment (Lahouassa et al., 2012) (Collaboration avec K. Baek, Atlanta USA). Les niveaux de dNTP sont normalisés par rapport aux niveaux d'expression des variants de SAMHD1 quantifiés comme en Figure 1B. Les barres d'erreur représentent la moyenne \pm std pour n=3 mesures indépendantes réalisées en duplicata. ****: $p < 0.0001$.

4/ Inter-relation entre la phosphorylation et la SUMOylation de SAMHD1

Les résultats précédents indiquent que la SUMOylation de SAMHD1, précisément sur le résidu K595, serait requise pour l'activité de restriction de la protéine. De manière intéressante, la phosphorylation du résidu adjacent T592 inhibe également l'activité antivirale de SAMHD1. Nous nous sommes donc demandé s'il existe une dépendance de ces deux modifications post-traductionnelles l'une pour l'autre.

Pour approfondir cette hypothèse, des cellules 293T exprimant de manière stable HA-SAMHD1 WT, le mutant phospho-mimétique T592E ou le mutant phospho-ablatif T592A et His-SUMO-2 ont été traitées ou non au MG132 (un inhibiteur du protéasome). Les cellules ont ensuite été lysées en conditions dénaturantes et les protéines His-SUMO-2 ont été purifiées sur une colonne de Nickel, immobilisant avec elles les formes de SAMHD1 modifiées par la SUMOylation. L'anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de SAMHD1 sur le résidu T592 a été utilisé pour révéler SAMHD1.

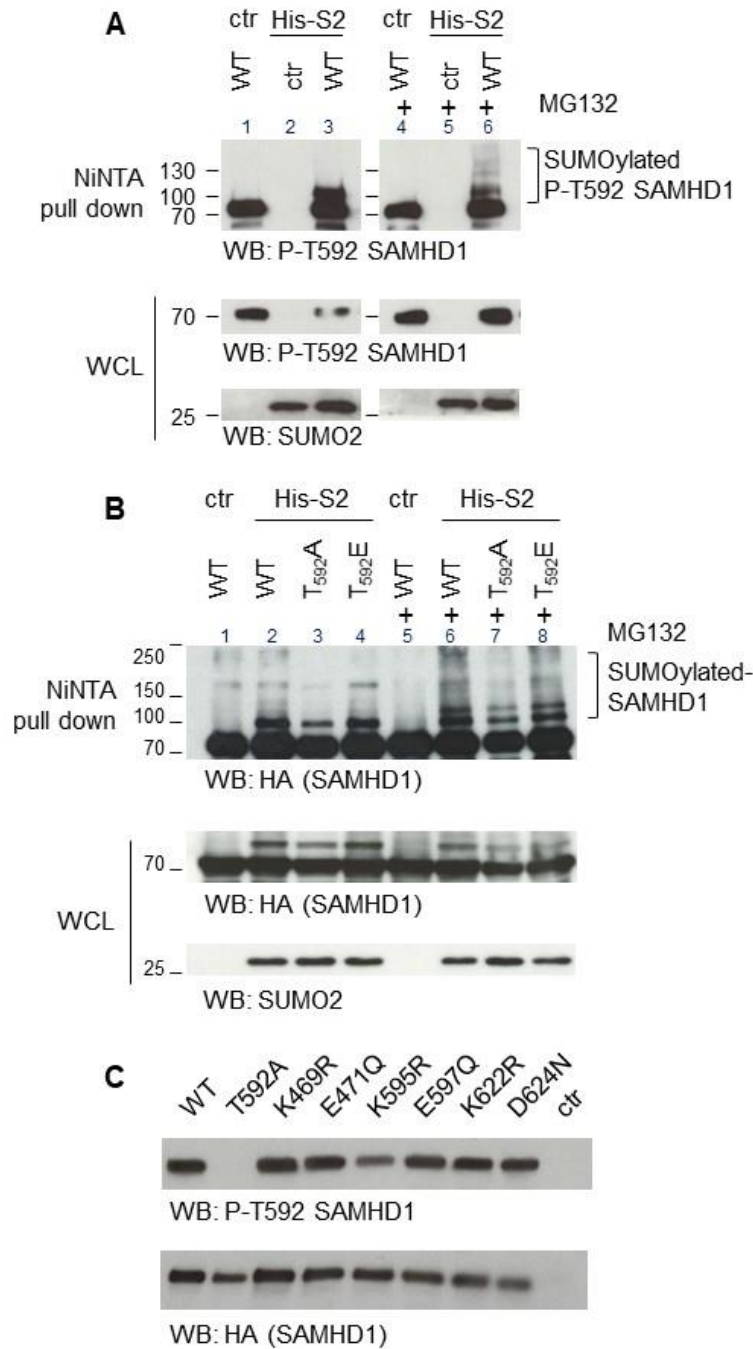


Figure 25. Interrelation entre la SUMOylation et la phosphorylation de SAMHD1.

Des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides codant pour His-SUMO-2 (His-S2), HA-SAMHD1 WT ou les mutants HA-SAMHD1 T592A, T592E, K469R, E471Q, K595R, E597Q, K622R ou D624N ou le plasmide contrôle (ctr). Après 24h, les cellules ont été traitées à l'inhibiteur du protéasome, le MG132 (3µM, O/N). Les cellules ont été lysées en conditions dénaturantes (guanidium HCl 6M, imidazole 10mM) pour inhiber les SUMO protéases et les protéines SUMOylées ont ensuite été enrichies sur une colonne de NiNTA. Après l'éluion, les protéines ont été séparées par électrophorèse et révélées par l'hybridation des anticorps spécifiques indiqués (A, B). L'expression de la forme phosphorylée des protéines SAMHD1 sur-exprimées a été révélée par Western blot à partir du lysat total cellulaire (WCL) des cellules 293T (C). P-T592 SAMHD1 : anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme phosphorylée de SAMHD1 sur le résidu T592.

Nous pouvons observer que la protéine SAMHD1 modifiée par SUMO-2 est également phosphorylée (Figure 25A, piste 3), ainsi que les formes multi-SUMOylées visibles en présence de MG132 (Figure 25A, piste 6) et contrairement aux contrôles négatifs sans SUMO-2 ou sans SAMHD1 (Figure 25A, pistes 1, 2, 4, 5).

Nous avons ensuite déterminé le statut de SUMOylation des mutants SAMHD1 phospho-mimétique T592E et phospho-ablatif T592A en procédant à une purification des protéines SUMO-2 par un Nickel Pull down comme décrit plus haut. En conditions basales, SAMHD1 WT et les deux mutants sont SUMOylées (Figure 25B, pistes 2 à 4) avec un signal légèrement moins prononcé pour le mutant T592A. De même, lorsque le protéasome est inhibé, le mutant phospho-mimétique T592E présente un profil de multi-SUMOylation similaire à la protéine sauvage (Figure 25B, pistes 6 et 8), le mutant phospho-ablatif T592A semble avoir le même profil mais l'intensité du signal est plus faible et suggère que ce mutant est moins SUMOylé (Figure 25B, piste 7). Pris ensemble, ces résultats indiquent que la phosphorylation favorise la multi-SUMOylation de SAMHD1.

Enfin, nous nous sommes demandés si la SUMOylation est requise pour la phosphorylation. Pour cela nous avons déterminé l'expression de la forme phosphorylée des mutants de SAMHD1 à partir d'extraits cellulaires totaux de cellules 293T. L'expression du mutant phospho-ablatif, qui sert de contrôle négatif, n'est pas détectée et valide l'approche expérimentale (Figure 25C). Les mutants des deux principaux sites de SUMOylation de SAMHD1 K469R, E471Q, K622R et D624N sont phosphorylés de manière comparable à la protéine sauvage. Néanmoins, le mutant du troisième site de SUMOylation K595R semble être légèrement moins phosphorylé. Le mutant du résidu acide du même site, E597Q est phosphorylé comme la protéine sauvage. Nous pouvons corréler ce dernier résultat au fait que le résidu K595 est adjacent au résidu phosphorylé T592 et fait partie intégrante du site consensus $^{592}\text{TPQK}^{595}$ de recrutement de la protéine « cyclin-dependent kinase » CDK2 (Cribier et al., 2013; Yan et al., 2015). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la SUMOylation de SAMHD1 sur le résidu K595 favoriserait le recrutement de la CDK2 et une meilleure phosphorylation.

5/ Conclusion

Nous avons appris de la caractérisation de SAMHD1 que sa SUMOylation sur le résidu K595 est impliquée dans la modulation de son pouvoir antiviral dans les cellules différenciées. En effet lorsque ce résidu est muté seul ou en combinaison avec les deux sites majeurs de SUMOylation, la protéine SAMHD1 n'est plus capable de rendre les cellules non-cyclantes résistantes à l'infection par le VIH-1.

De plus, nous avons montré pour la première fois que la perte de SUMOylation qui engendre une perte d'activité antivirale n'a aucun effet sur l'activité enzymatique principale de la protéine, en l'occurrence la réduction des niveaux cellulaires de dNTP. Nous montrons donc avec ces résultats

que les activités antivirale et enzymatique peuvent être distinguées alors que jusqu'ici le modèle de fonctionnement de SAMHD1 admettait que l'activité dNTPase était à l'origine de la restriction.

Enfin, nous avons montré que la phosphorylation n'empêche pas la SUMOylation (dans des cellules cyclantes et en condition de sur-expression). La SUMOylation du résidu K595 semble jouer un rôle dans la phosphorylation de la protéine sur le résidu T592. Il serait intéressant de déterminer si le mutant K595R interagit avec la CDK2 de manière similaire à la protéine sauvage.

Nous montrons donc que la SUMOylation sur le résidu K595 semble nécessaire pour l'inhibition de l'infection par le VIH-1 dans des cellules non-cyclantes. Il serait intéressant de déterminer si elle joue aussi un rôle dans la modulation de cette activité dans des cellules en division. Nos résultats laissent entrevoir un mécanisme de régulation par la SUMOylation dépendant de l'état de division de la cellule : dans des cellules en division, la SUMOylation favoriserait la phosphorylation peut-être en aidant au recrutement de CDK2 et participerait donc à l'inhibition de l'activité antivirale de SAMHD1 dans ces cellules. Dans des cellules non-cyclantes, la SUMOylation favoriserait le blocage de l'infection par le VIH-1, peut-être en recrutant un partenaire pour l'heure inconnu.

Troisième partie : Résultats préliminaires sur l'étude de la SUMOylation non-covalente de SAMHD1 et la recherche de partenaires cellulaires du facteur de restriction.

1/ Introduction

La SUMOylation est une modification des protéines qui n'implique pas seulement une interaction covalente avec leur cible. En effet les protéines SUMO peuvent engager des interactions non-covalentes avec des partenaires via un motif SIM « SUMO-interacting motif » (Kerscher, 2007; Minty et al., 2000; Song et al., 2004). L'analyse *in silico* de la séquence de SAMHD1 (présentée dans la Partie 1 des résultats, article prochainement soumis) a révélé la présence de deux motifs SIM. De plus, des résultats d'immunofluorescence indiquent que SAMHD1 n'engage pas que des interactions covalentes avec les protéines SUMO.

D'autre part, les résultats décrits plus haut suggèrent un rôle important pour la région C-terminale de SAMHD1, région qui contient les résidus K595 SUMOylé et T592 phosphorylé. Cette région pourrait représenter une interface de recrutement de co-facteur(s), pour l'heure méconnu(s), requis pour inhiber l'infection lentivirale dans les cellules non-cyclantes.

Cette troisième et dernière partie, présentant des résultats préliminaires, vise à clarifier les bases moléculaires sous-jacentes au mécanisme de régulation de l'activité antivirale de SAMHD1.

2/ SAMHD1 contient deux sites SIM dont un lui permet d'interagir avec SUMO

L'analyse *in silico* de la séquence de SAMHD1 à l'aide du logiciel Jassa révèle la présence de deux motifs SIM : ⁴⁸⁸LLDV⁴⁹¹ et ⁴⁹⁹IVDV⁵⁰² (Figure 26A). L'utilisation du logiciel de visualisation de structure tridimensionnelle Pymol nous permis de positionner ces deux SIM dans la structure de SAMHD1 et indique que le SIM1 (acides aminés 488 à 491) est exposé à la surface alors que le SIM2 (acides aminés 499 à 502) est enfoui dans la structure (Figure 26B).

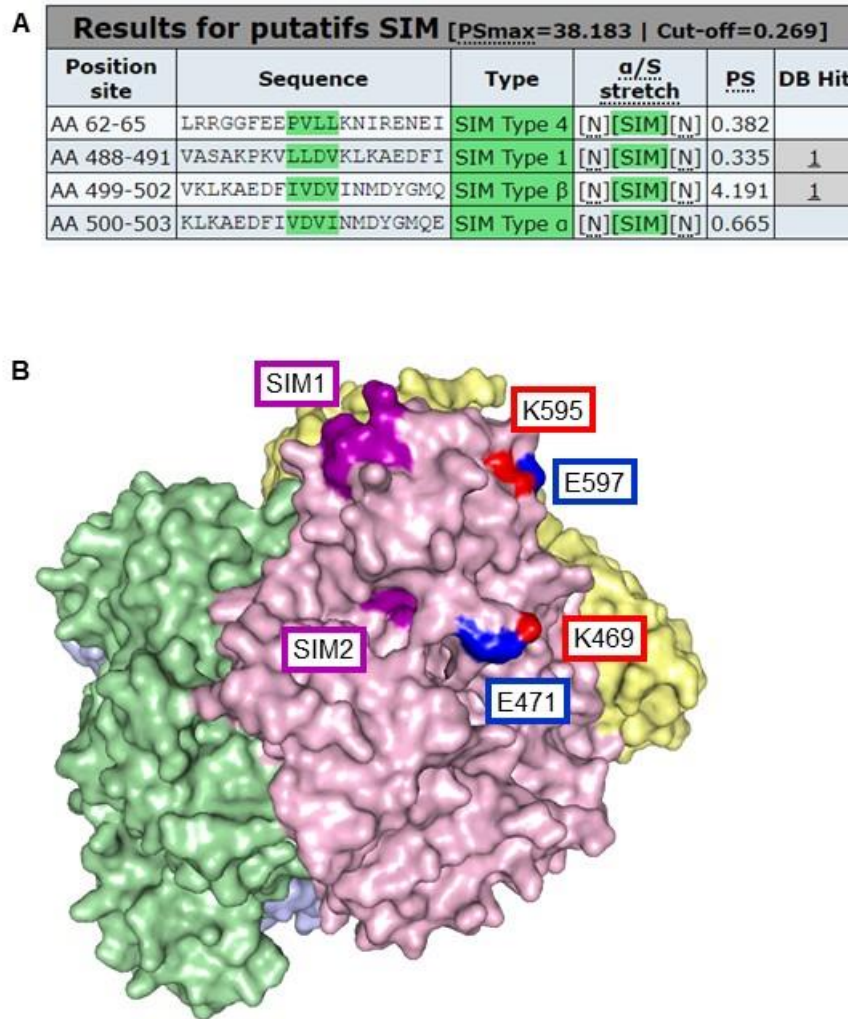


Figure 26. SAMHD1 contient deux sites SIM potentiellement fonctionnels.

(A) Tableau obtenu par analyse *in silico* de la séquence de SAMHD1 en utilisant le logiciel Jassa et représentant les sites SIM. Seulement deux SIM sur les quatres sont potentiellement fonctionnels (DB Hit). SIM1 : ⁴⁸⁸LLDV⁴⁹¹. SIM2 : ⁴⁹⁹IVDV⁵⁰². (B) Structure trimidimensionnelle de SAMHD1 obtenue avec le logiciel Pymol (PDB ID : 4BZC), indiquant deux des trois sites majeurs de SUMOylation (K469/E471 et K595/E597) et les deux sites SIM.

De plus, une expérience de « proximity ligation assay » (PLA) menée au cours de l'étude présentée Première Partie (article), et visant à déterminer l'interaction entre SUMO et SAMHD1 a révélé une interaction non-covalente entre ces deux partenaires. Cette expérience a été réalisée dans des cellules U937 différenciées et exprimant SAMHD1 WT ou les mutants de perte de SUMOylation 2KR et 2Ac. Comme le montre la Figure 27, un signal est détecté entre les protéines SUMO-2 endogènes et les trois protéines SAMHD1. Cela suggère que la mutation des sites consensus de SUMOylation n'empêche pas SAMHD1 d'interagir avec SUMO-2 et met donc en lumière la fonction de ses motifs SIM.

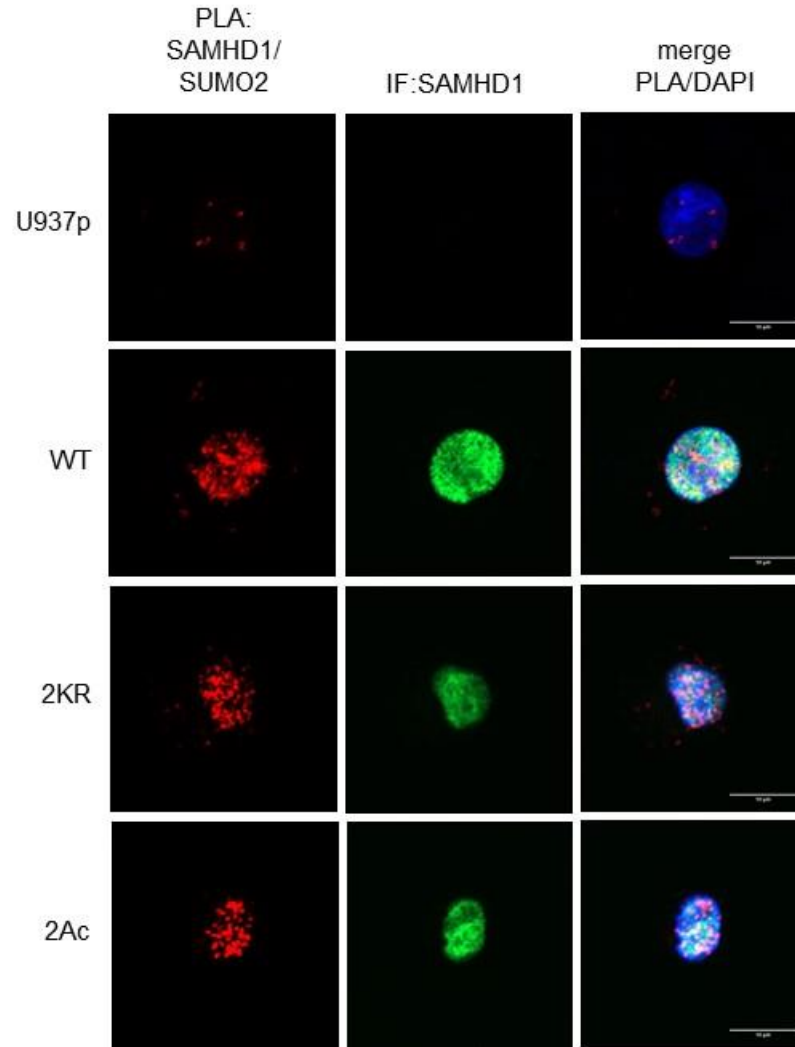


Figure 27. Les mutants de perte de SUMOylation de SAMHD1 interagissent toujours avec SUMO.

Des cellules U937 parentales (U937p) ou exprimant de manière stable SAMHD1 sauvage (WT) ou les mutants de perte de SUMOylation (2KR et 2Ac) ont été différenciées avec la PMA (100ng/mL, 2 jours). Après fixation (PFA 4%), les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-SAMHD1 et anti-SUMO-2/3 et utilisées selon le protocole de PLA (rouge). La localisation de SAMHD1 a été mesurée avec un anticorps secondaire Alexa₄₈₈ (green). Les noyaux ont été marqués au DAPI. Les images ont été obtenues avec un microscope confocal (LSM510 Meta; Carl Zeiss) avec objectif à immersion 63/1.4-N.

Afin de valider la fonctionnalité du SIM1, nous avons généré le mutant SAMHD1 SIM1 mut dans lequel la séquence ⁴⁸⁸LLDV⁴⁹¹ est mutée en ⁴⁸⁸AADA⁴⁹¹. Nous avons également couplé la mutation du SIM1 à celle du triple mutant 3KR dans lequel les trois sites principaux de SUMOylation sont mutés. Nous avons ensuite réalisé une expérience de PLA à partir de cellules U937 différenciées et exprimant de manière stable la protéine SAMHD1 sauvage ou ces deux mutants et à partir des niveaux endogènes de SUMO-2.

Comme attendu nous n’observons pas de signal dans les cellules parentales puisqu’elles n’expriment pas SAMHD1 (Figure 28, U937p). Le signal dans les cellules exprimant la protéine sauvage (WT) est faible mais il est comparable à celui obtenu dans les cellules exprimant le mutant

du SIM (SIM1 mut). Avec le triple mutant des sites de SUMOylation (3KR) on observe un signal plus prononcé. Enfin, lorsque l'on couple la mutation du SIM à celle des sites de SUMOylation, l'intensité du signal chute considérablement.

Cette expérience préliminaire (réalisée une seule fois au moment de la rédaction de ce manuscrit) semble indiquer que la mutation du SIM ne modifie pas l'interaction avec SUMO-2 (comparé à SAMHD1 sauvage) suggérant que SUMO-2 n'utilise pas ce motif pour interagir avec SAMHD1. Comment expliquer alors que le signal obtenu avec le mutant 3KR soit aussi fort ? Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe encore d'autres sites importants pour la SUMOylation non-covalente de SAMHD1. La structure de SAMHD1 indique que le SIM2 est enfoui sous la surface (Figure 26B), il serait tout de même intéressant de le tester dans une expérience similaire afin de s'assurer de son caractère non-fonctionnel avancé par les analyses *in silico*. Avant-tout il semble primordial d'approfondir ce premier résultat et de tester l'interaction de SAMHD1 avec le mutant du SIM1.

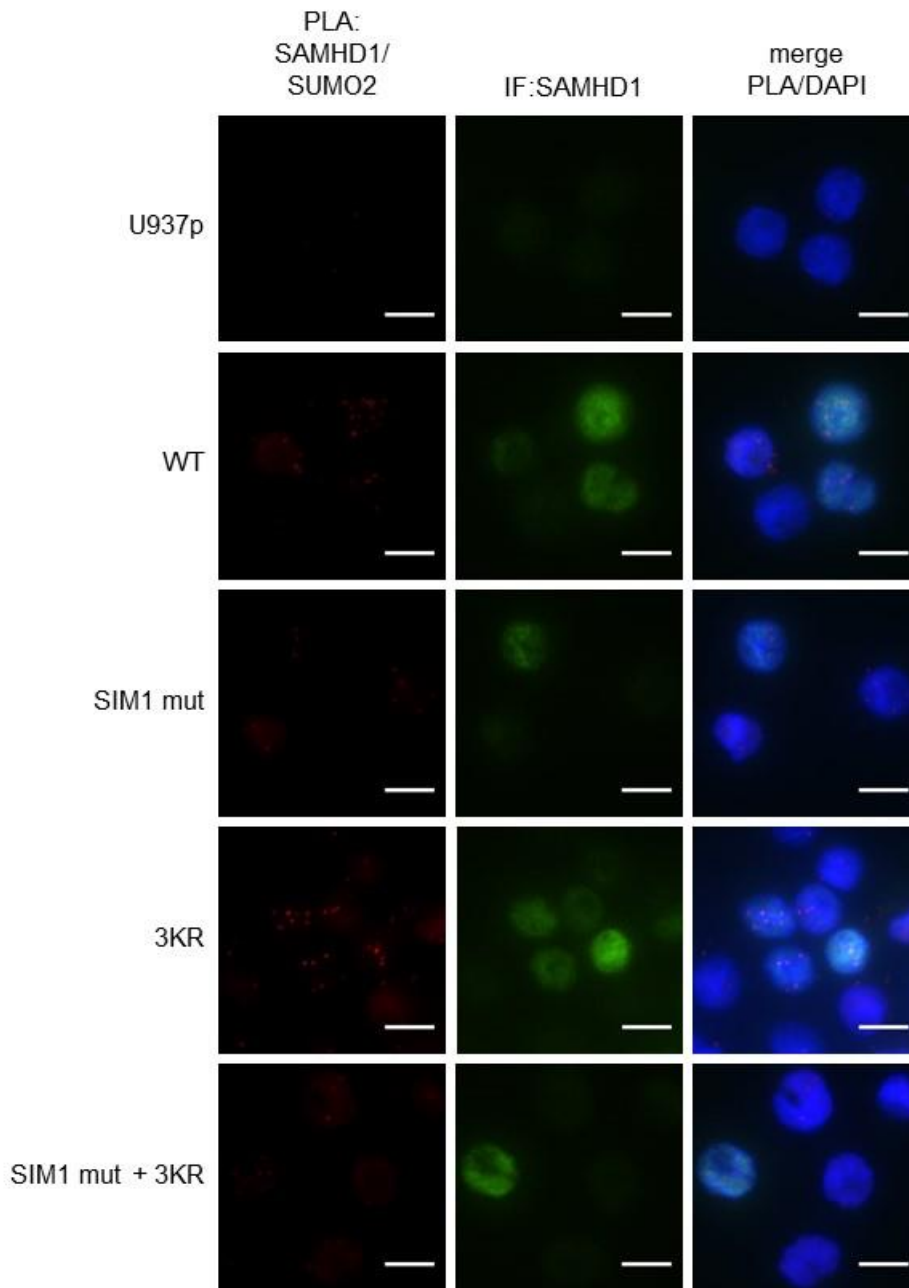


Figure 28. Effet de la mutation du SIM sur la SUMOylation de SAMHD1.

Des cellules U937 parentales (U937p) ou exprimant de manière stable SAMHD1 sauvage (WT), le mutant du SIM1 (SIM1 mut), le mutant des sites de SUMOylation (3KR) ou le double mutant (SIM1 mut + 3KR) ont été différenciées avec la PMA (100ng/mL, 2 jours). Après fixation (PFA 4%), les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-SAMHD1 et anti-SUMO-2/3 et utilisées selon le protocole de PLA (rouge). La localisation de SAMHD1 a été mesurée avec un anticorps secondaire Alexa₄₈₈ (green). Les noyaux ont été marqués au DAPI. Les images ont été obtenues avec un microscope confocal (LSM510 Meta; Carl Zeiss) avec objectif à immersion 63/1.4-N.

3/ Analyses protéomique et transcriptionnelle visant à identifier les co-facteurs de SAMHD1 (résultats préliminaires)

Dans le but d'identifier des protéines qui se lient à SAMHD1 en fonction de son état de SUMOylation et/ou en fonction de l'état de division des cellules (cyclantes ou non-cyclantes), nous avons mis en place deux approches complémentaires.

La première est une approche protéomique menée en collaboration avec Guillaume Bossis (IGMM, Montpellier). Sachant que la conjugaison des SUMO à leurs cibles peut générer une interface d'interaction avec des protéines contenant des SIM (Flotho et Melchior, 2013), une hypothèse pour expliquer le phénotype observé (et décrit plus haut) serait que la perte de SUMOylation empêcherait le recrutement de co-facteur(s) impliqué(s) dans le mécanisme de restriction virale menée par SAMHD1.

Considérant que la SUMOylation possède une dynamique rapide et que les protéines sous forme conjuguée ne sont pas stables dans le temps, il est difficile de mettre en place une approche protéomique classique. C'est pourquoi nous avons choisi de suivre un protocole optimisé dans le laboratoire de G. Bossis selon lequel il est possible de purifier des protéines recombinantes SUMOylées à partir de bactéries conçues pour exprimer les protéines His-SUMO et les composants de la machinerie de SUMOylation (Brockly et al., 2016).

Ces bactéries ont été transformées avec les plasmides codant pour la MBP ou « maltose binding protein » fusionnée à la protéine SAMHD1 WT ou mutante pour les sites de SUMOylation. L'étiquette Histidine et la protéine MBP permettent de faire des purifications en tandem afin de garder les formes SUMOylées de SAMHD1 et de se débarrasser des formes non conjuguées. Ce système a ainsi permis de produire de grandes quantités de protéines SUMOylées pour ensuite les déposer sur des plaques « Protoarrays » (Life Technology) dont la surface est recouverte de 9000 protéines recombinantes. Après l'incubation d'anticorps fluorescents dirigés contre SAMHD1 et SUMO, les plaques ont été lues et les résultats analysés avec le logiciel PAA (« Protein Array Analyzer »).

Les résultats préliminaires sont en cours d'analyses et nous permettrons de mettre en évidence l'interaction spécifique de la protéine SAMHD1 SUMOylée avec un certains nombres de protéines avec lesquelles elle n'interagit pas lorsqu'elle n'est pas modifiée.

La deuxième approche abordée est de nature transcriptionnelle et vise à comparer l'expression des gènes provenant de cellules où SAMHD1 est fonctionnelle à celle des gènes provenant de cellules où SAMHD1 est inactive. En effet, nous savons que l'activité de SAMHD1 dépend de l'état de prolifération des cellules puisque la protéine n'est pas active contre le VIH-1 dans les cellules qui se divisent alors qu'elle peut réduire l'infection dans les cellules qui ne se divisent pas. Cette approche a notamment servi à identifier SERINC5, le co-facteur de la protéine virale Nef (Rosa et al., 2015).

Nous avons identifié les gènes dont l'expression diffère entre les cellules permissives et les cellules résistantes au VIH-1, à partir de données de séquençage aléatoire du transcriptome (RNAseq) de : cellules T quiescentes contre activées (Zhao et al., 2014), monocytes contre macrophages (Dong et al., 2013) THP1 non différenciées contre THP1 différenciées (traitement PMA) (Phanstiel et al., 2017). Nous avons ensuite croisé les résultats des trois analyses comparatives pour identifier les similarités.

Nous avons trouvé en commun 33 transcrits régulés négativement (Figure 29A) et 11 transcrits régulés positivement (Figure 29B) lorsque les cellules cyclantes deviennent non-cyclantes. L'analyse des gènes régulés négativement avec le logiciel STRING indique que ces gènes forment un réseau dense de connexions (Figure 29C). L'utilisation du logiciel GOrilla (« Gene Ontology enRichment anaLysis and visuaLizAtion tool ») met en évidence que les gènes liés au cycle cellulaire et à la mitose sont majoritairement représentés. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire soient régulés négativement quand la cellule ne se divise plus. Cela permet aussi de valider notre approche expérimentale.

De manière intéressante, parmi les gènes régulés positivement lorsque la cellule arrête son cycle, on retrouve le récepteur à l'interleukine 7 (IL7R) ainsi qu'un gène inductible par l'IFN (ISG). A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore validé ces deux gènes.

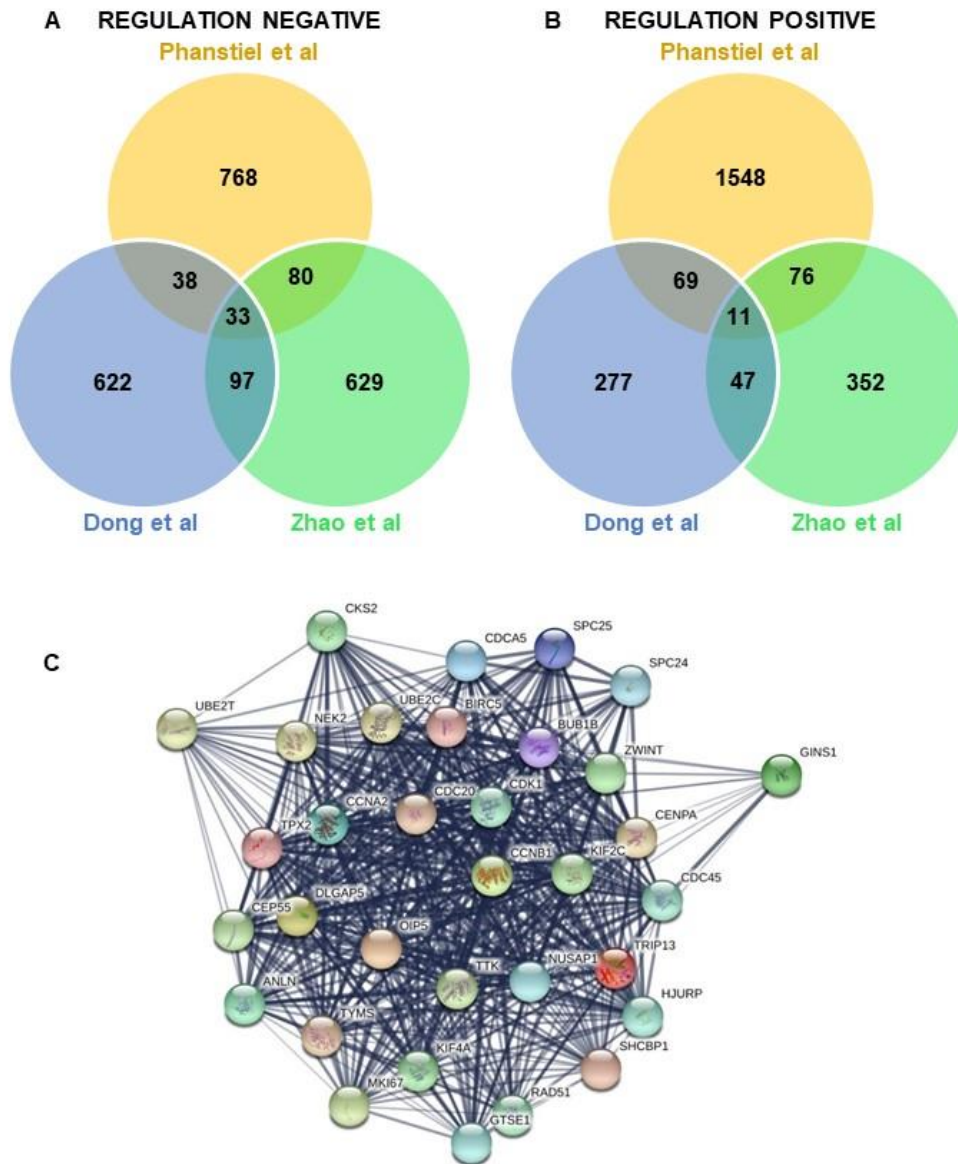


Figure 29. Analyses comparatives de données RNAseq de cellules cyclantes et non-cyclantes.

Diagramme de Venn illustrant les transcrits régulés négativement **(A)** et positivement **(B)**, obtenu à partir des données de RNAseq dans trois types cellulaires ciblés par le VIH-1 : cellules T quiescente contre activées (Zhao et al., 2014), monocytes contre macrophages (Dong et al., 2013), cellules THP1 traitées à la PMA contre non traitées (Phanstiel et al., 2017). **(C)** Analyse à partir des logiciels STRING et GO qui montre le réseau d’interaction entre les 33 gènes régulés négativement.

4/ Conclusion

De cette troisième et dernière partie nous ne pouvons que tirer des conclusions préliminaires. Il semblerait que le site SIM1 soit fonctionnel mais ne soit pas le seul motif à engager une interaction non-covalente avec SAMHD1. Approfondir cet aspect de la SUMOylation de SAMHD1 nous permettrait de savoir si SAMHD1 recrute un co-facteur par ce biais et de comprendre par quel mécanisme. Les analyses de protéomique et de transcriptomique ne sont qu’au stade préliminaire

également mais une fois que nous aurons identifié les protéines partenaires de SAMHD1 en fonction de l'état de division de la cellule, nous envisageons d'aborder les axes suivants :

- Nous analyserons l'expression des gènes sélectionnés en fonction des cellules (en division contre différenciées) par RT-qPCR par exemple.
- Nous étudierons l'implication des protéines identifiées dans le mécanisme de restriction mené par SAMHD1. Pour cela nous inhiberons leur expression dans des cellules THP1 (en utilisant des shARN par exemple).
- Afin d'établir l'étape de la réplication virale qui est touchée, nous mesurerons dans ces conditions la transcription inverse et l'intégration par RT-PCR, ainsi que les niveaux de dNTP.
- Enfin, nous validerons les candidats qui ont un effet sur la restriction antivirale dans des cellules primaires (macrophages ou cellules T quiescentes).

Comprendre les mécanismes sous-jacents à la régulation de l'activité de restriction de SAMHD1, en mettant au jour son interaction avec un ou plusieurs co-facteurs, aurait un impact important sur la communauté scientifique et permettrait d'entrevoir de nouveaux axes de recherches pour la mise au point de traitement anti-VIH.

DISCUSSION

Discussion

Bien que les fonctions cellulaires de SAMHD1 soient intensivement étudiées depuis son identification comme facteur de restriction du VIH-1 en 2011, on note un manque surprenant de données concernant sa régulation. De ce fait, le choix de modèles expérimentaux adaptés est limité et constitue un frein à l'approfondissement et à la compréhension de ces mécanismes.

1/ Mise en évidence d'une nouvelle voie de régulation de SAMHD1

Les équipes de Monsef Benkirane et de Felipe Diaz-Griffero sont les premières en 2013 à montrer que SAMHD1 est régulée par la phosphorylation dans les cellules cyclantes (Cribier et al., 2013; White et al., 2013b) et corrélient cette modification avec son absence d'activité antivirale dans ces cellules. C'est alors que la phosphorylation de SAMHD1 sur le résidu T592 est depuis considérée comme le principal mode de régulation de l'activité antivirale de la protéine. Mais la phosphorylation contrôle t-elle directement la restriction rétrovirale de SAMHD1 ou constitue t-elle simplement un marqueur de désactivation de la protéine ? Il n'y a, à l'heure actuelle, pas assez de données qui permettent d'affirmer que la phosphorylation de SAMHD1 abolit ses activités dNTPase et nucléase.

SAMHD1 est également modifiée par l'acétylation tant *in vitro* qu'*in vivo*, sur le résidu K405 (Lee et al., 2017). Son acétylation semble réguler positivement son activité dNTPase et jouer un rôle positif sur la prolifération des cellules de lignées cancéreuses. Enfin, le gène de SAMHD1 subit également une régulation épigénétique par la méthylation de son promoteur (de Silva et al., 2013). Le promoteur est méthylé dans les Jurkat et les Sup-T1 dans lesquelles l'expression de SAMHD1 est indétectable mais il ne l'est pas dans les THP1 et les lymphocytes primaires T CD4 dans lesquelles on observe de forts niveaux d'ARNm de SAMHD1 et de la protéine. Du point de vue clinique, on associe cette méthylation du promoteur de SAMHD1 à la réduction de l'expression de la protéine dans certains cancers (Wang et al., 2014).

Mes travaux apportent une information inédite car ils montrent que la SUMOylation, une autre modification post-traductionnelle, joue un rôle dans la régulation de SAMHD1. En effet j'ai montré qu'en condition de sur-expression des protéines dans des cellules cyclantes, SAMHD1 est modifiée par SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3. La mise au point d'une approche expérimentale permettant de connaître le profil de SUMOylation de SAMHD1 endogène ou dans un environnement cellulaire se rapprochant de la cellule ciblée par le VIH-1 est indispensable pour compléter les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse. En effet, alors que la forme phosphorylée de SAMHD1 est indétectable dans les cellules différenciées, l'expression de la protéine sauvage ne varie pas ou alors très faiblement entre une cellule différenciée et une cellule en division (Cribier et al., 2013; Welbourn et

al., 2013). Il serait donc intéressant de savoir ce qu'il en est de la forme SUMOylée dans les cellules différenciées.

La majorité des protéines ciblées par la SUMOylation sont nucléaires et possèdent un rôle important dans la régulation de la transcription, la structure de la chromatine ou la réparation de l'ADN. SAMHD1 est localisée dans le noyau (Baldauf et al., 2012; Brandariz-Nuñez et al., 2012; Rice et al., 2009), tout comme les protéines de la machinerie de SUMOylation. De manière cohérente, les résultats d'immunofluorescence que j'ai obtenu dans des cellules différenciées indiquent que les protéines endogènes SAMHD1 et SUMO-1 ou SUMO-2 co-localisent dans le noyau. Nous pouvons nous demander si la localisation nucléaire de SAMHD1 est indispensable pour sa SUMOylation. Si l'on inhibe l'import nucléaire, SAMHD1 est-elle toujours modifiée par les protéines SUMO ?

2/ Qu'advient-il de SAMHD1 après sa SUMOylation ?

J'ai également montré que les formes de SAMHD1 SUMOylées sont enrichies lorsque l'on inhibe le protéasome. Cela suggère une voie de dégradation de SAMHD1, selon laquelle la protéine serait SUMOylée puis modifiée par l'ubiquitine et enfin envoyée au protéasome. Ces résultats ouvrent plusieurs questions : 1) est-ce que SAMHD1 est ubiquitinylée et par quel type de chaînes poly-ubiquitine ? 2) est-ce que SAMHD1 est toujours ubiquitinylée lorsque l'on empêche sa SUMOylation ?

La majorité des travaux effectués sur SAMHD1 se placent dans le contexte de l'infection virale et un grand nombre s'intéresse donc à l'interaction de la protéine et sa régulation par Vpx, mais très peu de papiers se concentrent sur la régulation de la protéine indépendante de Vpx. On sait que la dégradation de SAMHD1 menée par Vpx implique le recrutement du complexe CUL4A/DDB1/DCAF1 qui ubiquitinye la protéine et l'envoie au protéasome (Schwefel et al., 2014; Srivastava et al., 2008). Schaller et al montrent qu'il s'agit d'une poly-ubiquitination par des chaînes d'ubiquitine K48 et K11 (Schaller et al., 2014).

Pour autant il n'y pas d'informations relatives à son ubiquitination indépendante de Vpx. Il serait aussi intéressant de savoir si SAMHD1 interagit avec le complexe CUL4A/DDB1/DCAF1 en absence de Vpx.

3/ Quelle implication pour les résidus K469 et K622 ?

Connaître la position des résidus de SAMHD1 ciblés par SUMO est indispensable pour comprendre comment la SUMOylation intervient dans les activités de la protéine mais aussi comprendre les relations entre les différentes voies de sa régulation.

Mes analyses biochimiques montrent que, dans des cellules en division, SAMHD1 est poly-SUMOylée sur le résidu Lysine K469 et mono-SUMOylée sur le résidu Lysine K622. Le fait de n'observer la poly-SUMOylation qu'en condition d'inhibition du protéasome est dû à la dynamique très rapide de conjugaison/déconjugaison ou conjugaison/dégradation des protéines. Lorsque l'on mute ces deux sites (mutant 2KR), on perd quasiment complètement la SUMOylation. Le résidu K469 est situé dans le domaine HD alors que le résidu K622 se trouve dans l'extrémité C-terminale.

Dans le contexte d'infection virale on sait que l'interface d'interaction entre SAMHD1 et Vpx est grande et met en jeu les résidus de SAMHD1 L610, V618, L620 et F621 ainsi que les trois résidus formant le motif tribasique R609, R617 et K622 (Laguette et al., 2012; Schwefel et al., 2014). De plus, le résidu K622 de SAMHD1 engage une liaison avec le résidu 1092 de la sous-unité DCAF1 du complexe ubiquitine E3 ligase qui lui même interagit avec Vpx. Pour autant, muter le motif tribasique dans le degon (NLS-GFP-SAMHD1 C-ter 600-626) réduit la capacité de Vpx à dégrader SAMHD1 mais n'empêche pas la région C-ter de restreindre le virus suggérant que ce motif n'est pas indispensable pour l'activité antivirale de SAMHD1. Ces données couplées à mes résultats montrent que K622 est un résidu important de SAMHD1, à l'interface de plusieurs mécanismes. Cependant, l'expression du mutant 2KR dans des cellules différenciées n'a aucun effet sur l'activité antivirale, l'activité dNTPase ou la localisation de SAMHD1.

On sait aussi que le domaine HD de SAMHD1 est important pour plusieurs de ses activités (Kang et al., 2016) comme son activité dNTPase (Goldstone et al., 2011), sa supposée activité nucléase (Ryoo et al., 2014), l'inhibition de la rétrotransposition de LINE-1 (Hu et al., 2015; Zhao et al., 2013) ainsi que l'interaction avec Vpx. Sachant que le résidu K469 se trouve dans ce domaine, il serait intéressant de comprendre l'impact de sa poly-SUMOylation sur un de ces aspects. Mes travaux nous permettent déjà de répondre à plusieurs questions : la mutation du K469 influence ni l'activité dNTPase de la protéine ni son activité antivirale. Il existe donc dans SAMHD1 d'autres déterminants impliqués dans la SUMOylation et la régulation de la protéine. C'est ce que nous montrons en nous intéressant au troisième résidu, K595.

4/ Le K595 : un résidu Lysine qui cache bien son jeu

Bien que nous n'ayons pas été à même de déterminer la SUMOylation endogène de SAMHD1 dans les cellules différenciées, nos résultats d'infection démontrent que la SUMOylation a un impact sur l'activité antivirale de SAMHD1 dans ce type cellulaire.

En effet, ajouter au mutant 2KR la mutation du troisième site K595 (mutant 3KR) a pour effet d'abolir complètement la SUMOylation de SAMHD1. D'un point de vue fonctionnel, le mutant 3KR n'a aucun effet sur l'activité dNTPase donc nous pouvons conclure que la SUMOylation ne module pas cette activité. Par contre le mutant 3KR n'est plus capable de contrer l'infection par les VIH-1 et VIH-2ΔVpx. Donc inhiber la SUMOylation de SAMHD1 sur ce site précisément (K595) a un effet délétère sur l'activité antivirale de la protéine. In fine, nous montrons que les activités antivirale et dNTPase sont indépendantes. Comme le mutant 3KR n'a aucun effet sur la restriction du VIH-2 on peut dire que la dégradation menée par Vpx fonctionne qu'il y ait ou pas de SUMOylation de SAMHD1.

Nos données suggèrent que la conjugaison de SUMO à SAMHD1 précisément sur le K595 est requise pour la restriction du VIH-1 mais pas pour l'activité dNTPase. Ce qui est intéressant c'est qu'on retrouve ce phénotype avec d'autres mutants : par exemple le mutant T592E empêche SAMHD1 de restreindre le virus mais n'altère pas son activité dNTPase, suggérant que SAMHD1, pour restreindre le VIH-1, ne doit pas être phosphorylée sur le T592, doit être SUMOylée sur le K595. Ces deux résidus se trouvant à l'extrémité C-ter, cette dernière est sûrement une interface de modification et de recrutement de partenaires cellulaires.

5/ La protéine mystère : identification d'un nouveau co-facteur de SAMHD1

Les données de la littérature ainsi qu'une partie de mes travaux indiquent que l'hydrolyse des dNTP par SAMHD1 participe en partie au mécanisme de restriction mais ne suffit pas à l'expliquer entièrement. Nos résultats désignent la nécessité d'une fonction additionnelle qui pourrait passer par le recrutement d'un co-facteur pour le moment inconnu et c'est l'extrémité C-ter de SAMHD1 qui semblerait être la région de liaison de ce co-facteur.

Dans les cellules non-cyclantes la transcription inverse du VIH-1 est retardée ou réduite indirectement par SAMHD1 qui hydrolyse les dNTP. Le recrutement d'un co-facteur par l'extrémité Cter de SAMHD1 semble être requis pour une inhibition efficace du virus mais est empêché par la phosphorylation ou par l'absence de SUMOylation ou par la délétion de l'extrémité Cter. La SUMOylation pourrait faire le lien entre les SAMHD1 et un co-facteur. Cela implique que ce dernier possède des sites SIM. SUMO interagirait de manière covalente avec SAMHD1 et recruterait le co-facteur par une interaction non-covalente. Ou bien le processus inverse est possible puisque l'on montre que le SIM1 de SAMHD1 est fonctionnel, il pourrait servir au recrutement d'un co-facteur SUMOylé de manière covalente ou bien lui aussi sur un site SIM.

6/ Hypothèses sur l'impact de la SUMOylation de SAMHD1 sur la réparation des cassures ADN

La majorité des protéines ciblées par la SUMOylation possèdent un rôle important dans la régulation de la transcription, la structure de la chromatine ou la réparation de l'ADN. De plus, on sait que SAMHD1 facilite la recombinaison homologue au niveau des cassures ADN double brin en recrutant la protéine CTIP (« C-terminal binding protein interacting protein »), un facteur de résection, au lieu de dommage (Daddacha et al., 2017). Il semblerait que cette activité soit indépendante de l'activité dNTPase et la potentielle activité nucléase. Sachant que la SUMOylation de SAMHD1 n'affecte pas son activité dNTPase, il est envisageable que la SUMOylation de SAMHD1 soit impliquée dans son rôle de protection contre les dommages de l'ADN. Le domaine d'interaction avec CTIP se trouve en région C-terminale de SAMHD1, il semblerait que le résidu K484 soit important puisque sa mutation entraîne une perte de fonction. On peut donc imaginer que la SUMOylation de SAMHD1 en C-terminal (résidus K595, K622) favorise le recrutement de CTIP sur SAMHD1 au niveau du résidu K484. Nous pouvons aussi nous demander si le résidu lui-même n'est pas ciblé par la SUMOylation dans un contexte unique de dommage à l'ADN. Cependant, nos analyses *in silico* ne révèlent pas ce résidu Lysine comme étant potentiellement SUMOylé. Savoir si un lien existe entre la SUMOylation et l'action de SAMHD1 dans la réparation des cassures ADN pourrait aussi avoir un impact dans le domaine du cancer. En effet, il semblerait que l'absence de SAMHD1 dans les cellules tumorales empêche la recombinaison homologue et soit létal pour la cellule.

7/ Modèle qui associe mes travaux aux données de la littérature

Prenant en considération les données de la littérature et mes résultats, voici le modèle proposé pour expliquer l'action de restriction de SAMHD1 contre la réplication virale, dans les deux contextes cellulaires différents (cellules en division contre cellules non-cyclantes).

Dans les cellules cyclantes (Figure 28, gauche), SAMHD1 sauvage phosphorylée, le mutant Δ C-ter et les mutants phospho-mimétique (TE), phospho-ablatif (TA) et de perte de SUMOylation (KR) maintiennent une faible activité dNTPase. Cependant, la synthèse de dNTP menée en continu par la RNR en phase S permet aux virus de procéder efficacement à la transcription inverse de son génome.

Dans les cellules non-cyclantes (Figure 28, droite), les mutants SAMHD1 Δ C-ter, phospho-mimétique (TE) et de perte de SUMOylation (KR) réduisent les niveaux de dNTP en dessous du seuil requis pour le bon déroulement de la transcription inverse (voie 1). Le recrutement d'un co-

facteur via la SUMOylation de SAMHD1 sauvage ou du mutant phospho-ablatif (TA) semble requis pour l'inhibition de l'infection par le VIH-1 (voie 2). Les voies (1) et (2) aboutissent à une réplication virale peu efficace.

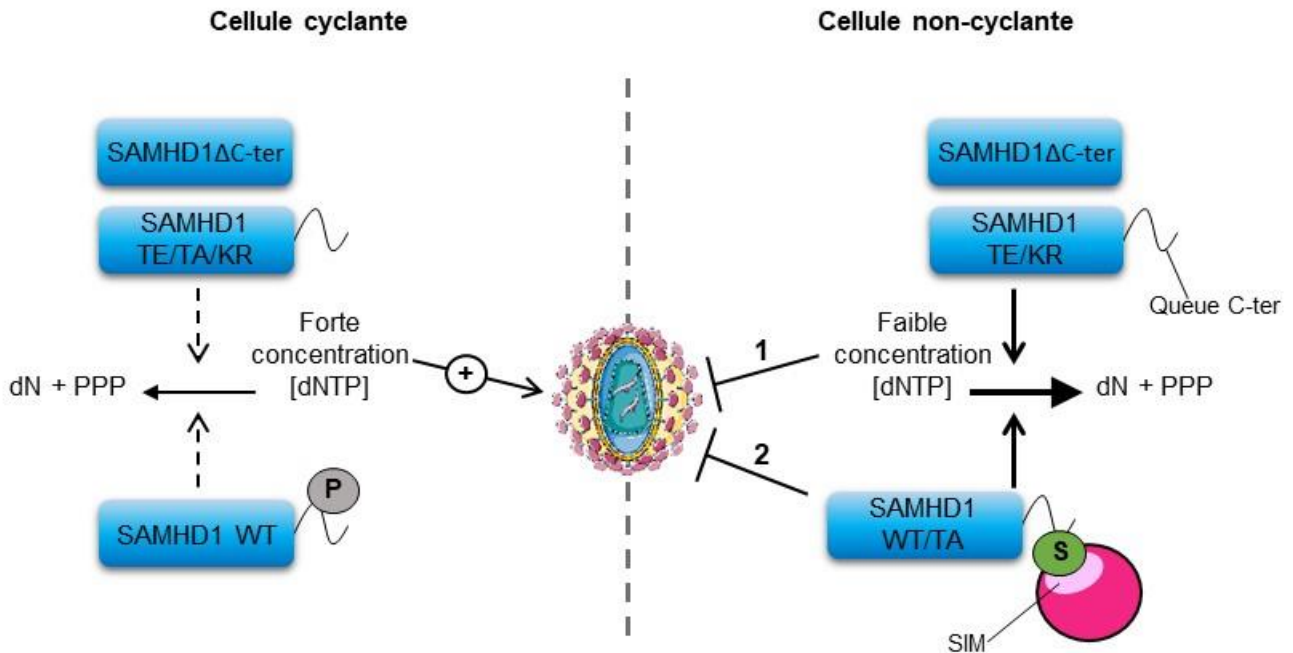


Figure 30. Modèle de restriction de SAMHD1 en fonction de l'état de division de la cellule.

SIM : SUMO-interacting motif ; S : SUMO ; P : groupement phosphate.

Enfin, une dernière question persiste : SAMHD1 confère-t-elle vraiment un avantage immunitaire à la cellule ou permet-elle plutôt au VIH-1 d'échapper au système de défense cellulaire, favorisant ainsi la pathogénicité du virus ?

A l'heure actuelle, suffisamment de données indiquent que SAMHD1 affecte la réplication du virus *in vivo*. Cependant, l'absence d'antagoniste de SAMHD1 chez le VIH-1 laisse penser que la restriction menée par la protéine dans les cellules de la lignée myéloïde et les cellules T quiescentes favorisent la persistance et l'échappement viral. Cette hypothèse peut être étayée par le fait que le VIH-2, qui exprime Vpx et induit la dégradation de SAMHD1, soit moins pathogène.

8/ Comment manipuler SAMHD1 à des fins thérapeutiques ?

La compréhension des mécanismes d'action des facteurs de restriction permet aussi d'entrevoir leur utilisation dans des traitements. Par exemple, plusieurs inhibiteurs de Vif ont été identifiés, empêchant la dégradation d'APOBEC3G et permettant ainsi d'inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* (Cen et al., 2010; Nathans et al., 2008; Zuo et al., 2012). Une approche thérapeutique serait de mimer les effets des facteurs de restriction à l'aide de molécules chimiques. C'est le cas de la molécule PF74, un inhibiteur du VIH-1 qui semble entraîner une désintégration précoce de la capsid tout comme le fait TRIM5 α (Shi et al., 2011).

De manière intéressante, des données suggèrent que l'AGS pourrait être traité avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse (Crow et al., 2014). En effet empêcher la transcription inverse des rétro-éléments endogènes bloquerait l'accumulation d'acides nucléiques pathogènes et limiterait ainsi l'activation du système immunitaire associé à l'AGS. De plus, des inhibiteurs de CDK et d'autres kinases qui sont déjà approuvés pour le traitement du cancer pourraient bloquer l'activité dNTPase de SAMHD1 et la réplication du VIH-1 (Pauls et al., 2014 ; Pogliaghi et al., 2014).

Des données indiquent que l'intégration du VIH-1 dans des gènes associés à des cancers ou au contrôle du cycle cellulaire semble donner un avantage aux cellules dans lesquelles le virus persiste et leur permettrait de survivre (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Des thérapies ciblant les cellules prolifératives infectées par le VIH pourrait donc constituer une stratégie curative intéressante.

Mieux comprendre les fonctions de SAMHD1 est primordial pour identifier de nouvelles façons de combattre plusieurs maladies comme celles causées par l'infection par le VIH-1. De plus, la compréhension des mécanismes de détection et d'évacuation des acides nucléiques par le système immunitaire est déterminante pour approfondir nos connaissances sur la réponse de notre organisme aux maladies infectieuses, comme l'infection par des Rétrovirus. Tout cela aiderait à la conception de nouvelles thérapies pour combattre les maladies qui touchent l'homme et sont caractérisées par un déséquilibre des niveaux de nucléotides.

Enfin, il existe de grandes variations de sensibilité au VIH-1 au sein de la population qui résultent en des différences notoires au niveau du développement du SIDA. Toutes ces variations ne peuvent pas être attribuées aux polymorphismes du complexe immun CMH ou du co-récepteur CCR5. Des variations génétiques dans la séquence des facteurs de restriction pourraient être également à l'origine des différences de réponses face à l'infection. Des sous-populations humaines présentent des défauts dans les gènes codant pour TRIM5 α (Torimiro et al., 2009), APOBEC3B (Kidd et al., 2007) et APOBEC3H (OhAinle et al., 2008). Pour autant le lien entre ces polymorphismes et la sensibilité altérée aux VIH-1/SIDA est un sujet controversé dans la littérature, mais pourrait constituer une branche supplémentaire de recherche pour la mise au point de thérapies.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aicardi, J., and Goutières, F. (1984). A Progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis: Aicardi and Goutieres: Basal Ganglia Calcifications. *Annals of Neurology* 15, 49–54.
- Ahn J (2016). Functional organization of human SAMHD1 and mechanisms of HIV-1 restriction. *Biol Chem. Apr*;397(4):373-9.
- Aiken, C. (2015). Quantum dots and the Kondo effect: Condensed-matter physics. *Nature* 526, 203–204.
- Allouch, A., Di Primio, C., Alpi, E., Lusic, M., Arosio, D., Giacca, M., and Cereseto, A. (2011). The TRIM Family Protein KAP1 Inhibits HIV-1 Integration. *Cell Host & Microbe* 9, 484–495.
- Aravind L, Koonin EV (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci. Dec*;23(12):469-72.
- Arnold, L.H., Groom, H.C.T., Kunzelmann, S., Schwefel, D., Caswell, S.J., Ordonez, P., Mann, M.C., Rueschenbaum, S., Goldstone, D.C., Pennell, S., et al. (2015). Phospho-dependent Regulation of SAMHD1 Oligomerisation Couples Catalysis and Restriction. *PLOS Pathogens* 11, e1005194.
- Arriagada, G., Muntean, L.N., and Goff, S.P. (2011). SUMO-Interacting Motifs of Human TRIM5 α are Important for Antiviral Activity. *PLoS Pathogens* 7, e1002019.
- Aviv, T., Lin, Z., Lau, S., Rendl, L.M., Sicheri, F., and Smibert, C.A. (2003). The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nature Structural & Molecular Biology* 10, 614–621.
- Ayaydin, F., and Dasso, M. (2004). Distinct In Vivo Dynamics of Vertebrate SUMO Paralogues \square D. *Molecular Biology of the Cell* 15, 11.
- Azevedo-Pereira, J.M., and Santos-Costa, Q. (2016). HIV Interaction With Human Host: HIV-2 As a Model of a Less Virulent Infection. *AIDS Reviews*. 10.
- Baczyk, D., Audette, M.C., Drewlo, S., Levytska, K., and Kingdom, J.C. (2017). SUMO-4: A novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLOS ONE* 12, e0178056.
- Badia, R., Pujantell, M., Torres-Torronteras, J., Menéndez-Arias, L., Martí, R., Ruzo, A., Pauls, E., Clotet, B., Ballana, E., Esté, J.A., et al. (2017). SAMHD1 is active in cycling cells permissive to HIV-1 infection. *Antiviral Research* 142, 123–135.
- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4 $^+$ T cells. *Nature Medicine* 18, 1682–1688.
- Ballana, E., and Esté, J.A. (2015). SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction. *Trends in Microbiology* 23, 680–692.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Barton, K., Winckelmann, A., and Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends in Microbiology* 24, 345–355.
- Bassin, R.H., Duran-Troise, G., Gerwin, B.I., and Rein, A. (1978). Abrogation of Fv-lb Restriction with Murine Leukemia Viruses Inactivated by Heat or by Gamma Irradiation. *J. VIROL.* 26, 10.

- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of Molecular Biology* 280, 275–286.
- Beck, C.R., Garcia-Perez, J.L., Badge, R.M., and Moran, J.V. (2011). LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 12, 187–215.
- Behrendt, R., Schumann, T., Gerbaulet, A., Nguyen, L.A., Schubert, N., Alexopoulou, D., Berka, U., Lienenklaus, S., Peschke, K., Gibbert, K., et al. (2013). Mouse SAMHD1 Has Antiretroviral Activity and Suppresses a Spontaneous Cell-Intrinsic Antiviral Response. *Cell Reports* 4, 689–696.
- Beitari, S., Ding, S., Pan, Q., Finzi, A., and Liang, C. (2017). Effect of HIV-1 Env on SERINC5 Antagonism. *Journal of Virology* 91, e02214-16.
- Bellail, A.C., Olson, J.J., and Hao, C. (2014). SUMO1 modification stabilizes CDK6 protein and drives the cell cycle and glioblastoma progression. *Nature Communications* 5.
- 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.
- Bentham, M. (2006). Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *Journal of General Virology* 87, 563–571.
- Bergamaschi A, Ayinde D, David A, Le Rouzic E, Morel M, Collin G, Descamps D, Damond F, Brun-Vezinet F, Nisole S, Margottin-Goguet F, Pancino G, Transy C (2009). The human immunodeficiency virus type 2 Vpx protein usurps the CUL4A-DDB1 DCAF1 ubiquitin ligase to overcome a postentry block in macrophage infection. *J Virol*. May;83(10):4854-60.
- Berger, A., Sommer, A.F.R., Zwarg, J., Hamdorf, M., Welzel, K., Esly, N., Panitz, S., Reuter, A., Ramos, I., Jatiani, A., et al. (2011). SAMHD1-Deficient CD14+ Cells from Individuals with Aicardi-Goutières Syndrome Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection. *PLoS Pathogens* 7, e1002425.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine Receptors as HIV-1 Coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology* 17, 657–700.
- Berkhout, B., and Hemert, F.J. va. (1994). The unusual nucleotide content of the HIV RNA genome results in a biased amino acid composition of HIV proteins. *Nucleic Acids Research* 22, 1705–1711.
- Besnier, C., Ylinen, L., Strange, B., Lister, A., Takeuchi, Y., Goff, S.P., and Towers, G.J. (2003). Characterization of Murine Leukemia Virus Restriction in Mammals. *Journal of Virology* 77, 13403–13406.
- Best S, Le Tissier P, Towers G, Stoye JP (1996). Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):826-9.
- Bex, F., and McDowall, A. (1997). The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transactivator Protein Tax Colocalizes in Unique Nuclear Structures with NF- κ B Proteins. *J. VIROL.* 71, 14.
- Bhattacharya, A., Wang, Z., White, T., Buffone, C., Nguyen, L.A., Shepard, C.N., Kim, B., Demeler, B., Diaz-Griffero, F., and Ivanov, D.N. (2016). Effects of T592 phosphomimetic mutations on tetramer stability and dNTPase activity of SAMHD1 can not explain the retroviral restriction defect. *Scientific Reports* 6.
- 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.
- Blanco-Melo, D., Venkatesh, S., and Bieniasz, P.D. (2012). Intrinsic Cellular Defenses against Human Immunodeficiency Viruses. *Immunity* 37, 399–411.
- Bloch, N., Gläsker, S., Sitaram, P., Hofmann, H., Shepard, C.N., Schultz, M.L., Kim, B., and Landau, N.R. (2017). A Highly Active Isoform of Lentivirus Restriction Factor SAMHD1 in Mouse. *Journal of Biological Chemistry* 292, 1068–1080.

- Blomster, H.A., Imanishi, S.Y., Siimes, J., Kastu, J., Morrice, N.A., Eriksson, J.E., and Sistonen, L. (2010). *In Vivo* Identification of Sumoylation Sites by a Signature Tag and Cysteine-targeted Affinity Purification. *Journal of Biological Chemistry* 285, 19324–19329.
- Boddy MN, Howe K, Etkin LD, Solomon E, Freemont PS (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*. Sep 5;13(5):971-82.
- Bogerd, H.P., Doehle, B.P., Wiegand, H.L., and Cullen, B.R. (2004). A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. 5.
- Bohl, C.R., Abrahamyan, L.G., and Wood, C. (2013). Human Ubc9 Is Involved in Intracellular HIV-1 Env Stability after Trafficking out of the Trans-Golgi Network in a Gag Dependent Manner. *PLoS ONE* 8, e69359.
- Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., and Owerbach, D. (2004). A M55V Polymorphism in a Novel *SUMO* Gene (*SUMO-4*) Differentially Activates Heat Shock Transcription Factors and Is Associated with Susceptibility to Type I Diabetes Mellitus. *Journal of Biological Chemistry* 279, 27233–27238.
- Bonifati, S., Daly, M.B., St. Gelais, C., Kim, S.H., Hollenbaugh, J.A., Shepard, C., Kennedy, E.M., Kim, D.-H., Schinazi, R.F., Kim, B., et al. (2016). SAMHD1 controls cell cycle status, apoptosis and HIV-1 infection in monocytic THP-1 cells. *Virology* 495, 92–100.
- Bour, S., Geleziunas, R., and Wainberg, M.A. (1995). The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) CD4 Receptor and Its Central Role in Promotion of HIV-1 Infection. *MICROBIOL. REV.* 59, 31.
- Brandariz-Nunez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J., and Martinez-Costas, J. (2010). Avian Reovirus NS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule-Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain. *Journal of Virology* 84, 4289–4301.
- Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J., and Martinez-Costas, J. (2010). IC-Tagging and Protein Relocation to ARV muNS Inclusions: A Method to Study Protein-Protein Interactions in the Cytoplasm or Nucleus of Living Cells. *PLoS ONE* 5, e13785.
- 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.
- Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J., White, T.E., Nguyen, L., Bhattacharya, A., Wang, Z., Demeler, B., Amie, S., Knowlton, C., Kim, B., et al. (2013a). Contribution of oligomerization to the anti-HIV-1 properties of SAMHD1. *Retrovirology* 10, 131.
- Brandariz-Nuñez, A., Roa, A., Valle-Casuso, J.C., Biris, N., Ivanov, D., and Diaz-Griffero, F. (2013b). Contribution of SUMO-interacting motifs and SUMOylation to the antiretroviral properties of TRIM5α. *Virology* 435, 463–471.
- Brennan, G., Kozyrev, Y., and Hu, S.-L. (2008). TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3569–3574.
- Brockly F, Piechaczyk M, Bossis G (2016). Production and Purification of Recombinant SUMOylated Proteins Using Engineered Bacteria. *Methods Mol Biol.*;1475:55-65.
- Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 6580–6584.
- Busnadiego, I., Kane, M., Rihn, S.J., Preugschas, H.F., Hughes, J., Blanco-Melo, D., Strouvelle, V.P., Zang, T.M., Willett, B.J., Boutell, C., et al. (2014). Host and Viral Determinants of Mx2 Antiretroviral Activity. *Journal of Virology* 88, 7738–7752.

- Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology* 13, 471–483.
- Campbell-Yesufu, O.T., and Gandhi, R.T. (2011). Update on Human Immunodeficiency Virus (HIV)-2 Infection. *Clinical Infectious Diseases* 52, 780–787.
- Capili, A.D., and Lima, C.D. (2007). Taking it step by step: mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways. *Current Opinion in Structural Biology* 17, 726–735.
- Cappadocia, L., Pichler, A., and Lima, C.D. (2015). Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 968–975.
- 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.
- Celerino da Silva, R., Segat, L., and Crovella, S. (2011). Role of DC-SIGN and L-SIGN receptors in HIV-1 vertical transmission. *Human Immunology* 72, 305–311.
- Cen, S., Peng, Z.-G., Li, X.-Y., Li, Z.-R., Ma, J., Wang, Y.-M., Fan, B., You, X.-F., Wang, Y.-P., Liu, F., et al. (2010). Small Molecular Compounds Inhibit HIV-1 Replication through Specifically Stabilizing APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 285, 16546–16552.
- Chang, P.-C., and Kung, H.-J. (2014). SUMO and KSHV Replication. *Cancers* 6, 1905–1924.
- 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.
- Christ, F., Thys, W., De Rijck, J., Gijsbers, R., Albanese, A., Arosio, D., Emiliani, S., Rain, J.-C., Benarous, R., Cereseto, A., et al. (2008). Transportin-SR2 Imports HIV into the Nucleus. *Current Biology* 18, 1192–1202.
- Churchill, M.J., Deeks, S.G., Margolis, D.M., Siliciano, R.F., and Swanstrom, R. (2016). HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nature Reviews Microbiology* 14, 55–60.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nature Medicine* 11, 1287–1289.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M., Laurent, A., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.
- Clifford, R., Louis, T., Robbe, P., Ackroyd, S., Burns, A., Timbs, A.T., Wright Colopy, G., Dreau, H., Sigaux, F., Judde, J.G., et al. (2014). SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood* 123, 1021–1031.
- Coiras, M., Bermejo, M., Descours, B., Mateos, E., García-Pérez, J., López-Huertas, M.-R., Lederman, M.M., Benkirane, M., and Alcamí, J. (2016). IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Reports* 14, 2100–2107.
- Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2002). The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO Reports* 3, 1062–1068.
- Coppola, D., Parikh, V., Boulware, D., and Blanck, G. (2009). Substantially reduced expression of PIAS1 is associated with colon cancer development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 135, 1287–1291.
- Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguette, N., and Benkirane, M. (2013). Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1. *Cell Reports* 3, 1036–1043.

- Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006a). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nature Genetics* 38, 910–916.
- Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., et al. (2006b). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nature Genetics* 38, 917–920.
- Crow, Y.J., Vanderver, A., Orcesi, S., Kuijpers, T.W., and Rice, G.I. (2014). Therapies in Aicardi-Goutières syndrome: Therapies in AGS. *Clinical & Experimental Immunology* 175, 1–8.
- Da Silva-Ferrada, E., Ribeiro-Rodrigues, T.M., Rodríguez, M.S., and Girão, H. (2016). Proteostasis and SUMO in the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 79, 443–450.
- Daddacha, W., Koyen, A.E., Bastien, A.J., Head, P.E., Dhere, V.R., Nabeta, G.N., Connolly, E.C., Werner, E., Madden, M.Z., Daly, M.B., et al. (2017). SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell Reports* 20, 1921–1935.
- Damme, N.V., Goff, D., Katsura, C., and Jorgenson, R.L. (2009). The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu. 17.
- David Pauza, C. (1990). Two bases are deleted from the termini of HIV-1 linear DNA during integrative recombination. *Virology* 179, 886–889.
- Desterro, J.M.P., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D., and Hay, R.T. (1999). Identification of the Enzyme Required for Activation of the Small Ubiquitin-like Protein SUMO-1. *Journal of Biological Chemistry* 274, 10618–10624.
- Diamond, T.L., Roshal, M., Jamburuthugoda, V.K., Reynolds, H.M., Merriam, A.R., Lee, K.Y., Balakrishnan, M., Bambara, R.A., Planelles, V., Dewhurst, S., et al. (2004). Macrophage Tropism of HIV-1 Depends on Efficient Cellular dNTP Utilization by Reverse Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 51545–51553.
- Diaz-Griffero, F., Li, X., Javanbakht, H., Song, B., Welikala, S., Stremlau, M., and Sodroski, J. (2006). Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology* 349, 300–315.
- Diaz-Griffero, F., Qin, X., Hayashi, F., Kigawa, T., Finzi, A., Sarnak, Z., Lienlaf, M., Yokoyama, S., and Sodroski, J. (2009). A B-Box 2 Surface Patch Important for TRIM5 Self-Association, Capsid Binding Avidity, and Retrovirus Restriction. *Journal of Virology* 83, 10737–10751.
- Dong, C., Zhao, G., Zhong, M., Yue, Y., Wu, L., and Xiong, S. (2013). RNA sequencing and transcriptomal analysis of human monocyte to macrophage differentiation. *Gene* 519, 279–287.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4721–4732.
- Dubé, M., Bhusan Roy, B., Guiot-Guillain, P., Binette, J., Mercier, J., Chiasson, A., and Cohen, É.A. (2010). Antagonism of Tetherin Restriction of HIV-1 Release by Vpu Involves Binding and Sequestration of the Restriction Factor in a Perinuclear Compartment. *PLoS Pathogens* 6, e1000856.
- Duggal, N.K., and Emerman, M. (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nature Reviews Immunology* 12, 687–695.
- Duran-Troise G, Bassin RH, Rein A, Gerwin BI (1977). Loss of Fv-1 restriction in Balb/3T3 cells following infection with a single N tropic murine leukemia virus particle. *Cell*. 1977 Mar;10(3):479-88.
- Dutrieux, J., Portilho, D.M., Arhel, N.J., Hazan, U., and Nisole, S. (2015). TRIM5 α is a SUMO substrate. *Retrovirology* 12.

- Eifler, K., and Vertegaal, A.C.O. (2015). SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 779–793.
- Eisenhardt, N., Chaugule, V.K., Koidl, S., Droscher, M., Dogan, E., Rettich, J., Sutinen, P., Imanishi, S.Y., Hofmann, K., Palvimo, J.J., et al. (2015). A new vertebrate SUMO enzyme family reveals insights into SUMO-chain assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 959–967.
- Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempé, D., Vandekerckhove, L., Moisant, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., et al. (2005). Integrase Mutants Defective for Interaction with LEDGF/p75 Are Impaired in Chromosome Tethering and HIV-1 Replication. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25517–25523.
- Engelman, A., Kessl, J.J., and Kvaratskhelia, M. (2013). Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity. *Current Opinion in Chemical Biology* 17, 339–345.
- Enserink, J.M. (2015). Sumo and the cellular stress response. *Cell Division* 10.
- Erker, Y., Neyret-Kahn, H., Seeler, J.S., Dejean, A., Atfi, A., and Levy, L. (2013). Arkadia, a Novel SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase Involved in PML Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 33, 2163–2177.
- Esnault, C. (2006). Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Research* 34, 1522–1531.
- Fassati, A. (2003). Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *The EMBO Journal* 22, 3675–3685.
- Fassati, A., and Goff, S. (1999). Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Moloney Murine Leukemia Virus. *J. VIROL.* 73, 7.
- Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H., and Boeke, J.D. (1996). Human L1 Retrotransposon Encodes a Conserved Endonuclease Required for Retrotransposition. *Cell* 87, 905–916.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., and Luhrmann, R. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. 8.
- Flotho, A., and Melchior, F. (2013). Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry* 82, 357–385.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell* 90, 1051–1060.
- Francis, S.H., Colbran, J., McAUister-Lucas, L.M., and Corbin, J. (1994). Zinc Interactions and Conserved Motifs of the cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase Suggest That It Is a Zinc Hydrolase. 5.
- Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., Reichard, P., and Bianchi, V. (2013). The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 14272–14277.
- Fregoso, O.I., Ahn, J., Wang, C., Mehrens, J., Skowronski, J., and Emerman, M. (2013). Evolutionary Toggling of Vpx/Vpr Specificity Results in Divergent Recognition of the Restriction Factor SAMHD1. *PLoS Pathogens* 9, e1003496.
- Fribourgh, J.L., Nguyen, H.C., Matreyek, K.A., Alvarez, F.J.D., Summers, B.J., Dewdney, T.G., Aiken, C., Zhang, P., Engelman, A., and Xiong, Y. (2014). Structural Insight into HIV-1 Restriction by MxB. *Cell Host & Microbe* 16, 627–638.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of Human Immunodeficiency Virus Transcription: P-TEFb Phosphorylates RD and Dissociates Negative Effectors from the Transactivation Response Element. *Molecular and Cellular Biology* 24, 787–795.

- Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A., and Sodroski, J. (1992). Role of vif in Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in CD4+ T Lymphocytes. *J. VIROL.*
- Galão, R.P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., and Neil, S.J.D. (2012). Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NFκB-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host & Microbe* 12, 633–644.
- García-Rodríguez, N., Wong, R.P., and Ulrich, H.D. (2016). Functions of Ubiquitin and SUMO in DNA Replication and Replication Stress. *Frontiers in Genetics*.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 861–871.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H., Nottet, H.S.L., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* 100, 587–597.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 947–956.
- Ghimire, D., Rai, M., and Gaur, R. (2018). Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *Journal of General Virology* 99, 435–446.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Development* 18, 2046–2059.
- Girolomoni, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunology Today* 18, 102–104.
- Gobeil, L.-A., Lodge, R., and Tremblay, M.J. (2013). Macropinocytosis-Like HIV-1 Internalization in Macrophages Is CCR5 Dependent and Leads to Efficient but Delayed Degradation in Endosomal Compartments. *Journal of Virology* 87, 735–745.
- 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., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480, 379–382.
- Gon, S., Napolitano, R., Rocha, W., Coulon, S., and Fuchs, R.P. (2011). Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19311–19316.
- Goncalves, A., Karayel, E., Rice, G.I., Bennett, K.L., Crow, Y.J., Superti-Furga, G., and Bürckstümmer, T. (2012). SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to aicardi-goutières syndrome-associated mutations. *Human Mutation* 33, 1116–1122.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981 Dec 10;305(24):1425-31.
- Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 3195–3199.
- 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, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, 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, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Barclay, W.S., and Malim, M.H. (2014). Transfer of the Amino-Terminal Nuclear Envelope Targeting Domain of Human MX2 Converts MX1 into an HIV-1 Resistance Factor. *Journal of Virology* *88*, 9017–9026.
- Gramberg, T., Sunseri, N., and Landau, N.R. (2009). Accessories to the crime: Recent advances in HIV accessory protein biology. *Current HIV/AIDS Reports* *6*, 36–42.
- Greber, U.F., Singh, I., and Helenius, A. (1994). Mechanisms of virus uncoating. *Trends in Microbiology* *2*, 52–56.
- Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.-L., and Muriaux, D. (2006). Assembly of Infectious HIV-1 in Human Epithelial and T-Lymphoblastic Cell Lines. *Journal of Molecular Biology* *359*, 848–862.
- Grütter, M.G., and Luban, J. (2012). TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Current Opinion in Virology* *2*, 142–150.
- Guerra de Souza, A.C., Prediger, R.D., and Cimarosti, H. (2016). SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* *137*, 673–686.
- Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A., et al. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I κ B α modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature Genetics* *36*, 837–841.
- Guo, H., Wei, W., Wei, Z., Liu, X., Evans, S.L., Yang, W., Wang, H., Guo, Y., Zhao, K., Zhou, J.-Y., et al. (2013). Identification of Critical Regions in Human SAMHD1 Required for Nuclear Localization and Vpx-Mediated Degradation. *PLoS ONE* *8*, e66201.
- Gupta, M.K., McLendon, P.M., Gulick, J., James, J., Khalili, K., and Robbins, J. (2016). UBC9-Mediated Sumoylation Favorably Impacts Cardiac Function in Compromised Hearts. *Novelty and Significance. Circulation Research* *118*, 1894–1905.
- Gurer, C., Berthoux, L., and Luban, J. (2005). Covalent Modification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 by SUMO-1. *Journal of Virology* *79*, 910–917.
- Hamel, D.J., Sankalé, J.-L., Eisen, G., Meloni, S.T., Mullins, C., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., and Kanki, P.J. (2007). Twenty Years of Prospective Molecular Epidemiology in Senegal: Changes in HIV Diversity. *AIDS Research and Human Retroviruses* *23*, 1189–1196.
- Hancks, D.C., and Kazazian, H.H. (2012). Active human retrotransposons: variation and disease. *Current Opinion in Genetics & Development* *22*, 191–203.
- 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* *111*, E1843–E1851.
- Hare, S., and Cherepanov, P. (2009). The Interaction Between Lentiviral Integrase and LEDGF: Structural and Functional Insights. *Viruses* *1*, 780–801.
- Heikenwalder, M., and Protzer, U. (2014). LINE(1)s of Evidence in HBV-Driven Liver Cancer. *Cell Host & Microbe* *15*, 249–250.
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine* *18*, 182–192.

- 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.
- Hendriks, I.A., D'Souza, R.C., Chang, J.-G., Mann, M., and Vertegeal, A.C.O. (2015). System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites. *Nature Communications*.
- Herrmann, A., Wittmann, S., Thomas, D., Shepard, C.N., Kim, B., Ferreirós, N., and Gramberg, T. (2018). The SAMHD1-mediated block of LINE-1 retroelements is regulated by phosphorylation. *Mobile DNA* 9.
- Hickey, C.M., Wilson, N.R., and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 755–766.
- Hofmann, H., Logue, E.C., Bloch, N., Daddacha, W., Polsky, S.B., Schultz, M.L., Kim, B., and Landau, N.R. (2012). The Vpx Lentiviral Accessory Protein Targets SAMHD1 for Degradation in the Nucleus. *Journal of Virology* 86, 12552–12560.
- Hofmann, W., Schubert, D., Labonte, J., Munson, L., Gibson, S., SCAMMELL, J., FERRIGNO, P., and SODROSKI, J. (1999). Species-Specific, Postentry Barriers to Primate Immunodeficiency Virus Infection. *J. VIROL.* 73, 9.
- 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.
- Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006882–a006882.
- Hu, S., Li, J., Xu, F., Mei, S., Le Duff, Y., Yin, L., Pang, X., Cen, S., Jin, Q., Liang, C., et al. (2015). SAMHD1 Inhibits LINE-1 Retrotransposition by Promoting Stress Granule Formation. *PLOS Genetics* 11, e1005367.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.-H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential Modification of NEMO/IKK α by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF- κ B Activation by Genotoxic Stress. 12.
- Huber, H.E., Beauchamp, B.B., and Richardson, C.C. (1988). Escherichia coli dGTP Triphosphohydrolases Inhibited by Gene1.2 Protein of Bacteriophage T7. 8.
- Hue, S., Gifford, R.J., Dunn, D., Fernhill, E., Pillay, D., and on Behalf of the UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance (2009). Demonstration of Sustained Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Lineages Circulating among Treatment-Naive Individuals. *Journal of Virology* 83, 2645–2654.
- Hulme, A.E., Bogerd, H.P., Cullen, B.R., and Moran, J.V. (2007). Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene* 390, 199–205.
- Inuzuka, M., Hayakawa, M., and Ingi, T. (2005). Serinc, an Activity-regulated Protein Family, Incorporates Serine into Membrane Lipid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35776–35783.
- Jaber, T., Bohl, C.R., Lewis, G.L., Wood, C., West, J.T., and Weldon, R.A. (2009). Human Ubc9 Contributes to Production of Fully Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions. *Journal of Virology* 83, 10448–10459.
- Jáuregui P, Logue EC, Schultz ML, Fung S, Landau NR (2015). Degradation of SAMHD1 by Vpx Is Independent of Uncoating. *J Virol.* May;89(10):5701-13.
- Jayappa, K.D., Ao, Z., Wang, X., Moulant, A.J., Shekhar, S., Yang, X., and Yao, X. (2015). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Employs the Cellular Dynein Light Chain 1 Protein for Reverse Transcription through Interaction with Its Integrase Protein. *Journal of Virology* 89, 3497–3511.

- Ji, X., Tang, C., Zhao, Q., Wang, W., and Xiong, Y. (2014). Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E4305–E4314.
- Jia, B., Serra-Moreno, R., Neidermyer, 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, e1000429.
- Jia, X., Weber, E., Tokarev, A., Lewinski, M., Rizk, M., Suarez, M., Guatelli, J., and Xiong, Y. (2014). Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *ELife*.
- Johnson, E.S. (2004). Protein Modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry* 73, 355–382.
- Johnson, W.E., and Sawyer, S.L. (2009). Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* 61, 163–176.
- Johnson, G.S., Adler, R., Collins, J.J., and Court, D. (1979). Role of the SPOT Gene Product and Manganese Ion in the Metabolism of Guanosine 5'-Diphosphate 3'-Diphosphate in *Escherichia coli*. 6.
- Jongjitwimol, J., Baldock, R.A., Morley, S.J., and Watts, F.Z. (2016). Sumoylation of eIF4A2 affects stress granule formation. *Journal of Cell Science* 129, 2407–2415.
- Juarez-Vicente, F., Luna-Pelaez, N., and Garcia-Dominguez, M. (2016). The Sumo protease Senp7 is required for proper neuronal differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 1490–1498.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T.H. (1998). Characterization of a Second Member of the Sentrin Family of Ubiquitin-like Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11349–11353.
- Kampf, C., Olsson, I., Ryberg, U., Sjöstedt, E., and Pontén, F. (2012). Production of Tissue Microarrays, Immunohistochemistry Staining and Digitalization Within the Human Protein Atlas. *Journal of Visualized Experiments*.
- 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., et al. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 563–566.
- Kang, J., Hou, J., Zhao, K., Yu, X.-F., and Du, J. (2016). HD domain of SAMHD1 influences Vpx-induced degradation at a post-interaction step. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470, 690–696.
- Kanki, P.J., Travers, K.U., Marlink, R.G., Essex, M.E., MBoup, S., Gueye-NDiaye, A., Siby, T., Thior, I., Sankalé, J.-L., Hsieh, C.-C., et al. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *The Lancet* 343, 943–946.
- Kelley, J.B., Talley, A.M., Spencer, A., Gioeli, D., and Paschal, B.M. (2010). Karyopherin a7 (KPNA7), a divergent member of the importin a family of nuclear import receptors. 12.
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction—what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports* 8, 550–555.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 159–180.
- Kfoury, Y., Setterblad, N., El-Sabban, M., Zamborlini, A., Dassouki, Z., Hajj, H.E., Hermine, O., and Pique, C. (2011). Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. 117, 11.
- Kidd, J.M., Newman, T.L., Tuzun, E., Kaul, R., and Eichler, E.E. (2007). Population Stratification of a Common APOBEC Gene Deletion Polymorphism. *PLoS Genetics* 3, e63.

- Kim, B., Nguyen, L.A., Daddacha, W., and Hollenbaugh, J.A. (2012). Tight Interplay among SAMHD1 Protein Level, Cellular dNTP Levels, and HIV-1 Proviral DNA Synthesis Kinetics in Human Primary Monocyte-derived Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 287, 21570–21574.
- Koidl S, Eisenhardt N, Fatouros C, Droescher M, Chaugule VK, Pichler A (2016). The SUMO2/3 specific E3 ligase ZNF451-1 regulates PML stability. *Int J Biochem Cell Biol.* Oct;79:478-487.
- Kondo, E., and Gottlinger, H.G.G. (1996). A Conserved LXXLF Sequence Is the Major Determinant in p6gag Required for the Incorporation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr. *J. VIROL.* 70, 6.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin α . *Journal of Biological Chemistry* 284, 478–485.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 9112–9117.
- Kumar, D., Abdulovic, A.L., Viberg, J., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., and Chabes, A. (2011). Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Research* 39, 1360–1371.
- Kumar, R., González-Prieto, R., Xiao, Z., Verlaan-de Vries, M., and Vertegaal, A.C.O. (2017). The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nature Communications* 8.
- 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: A Raft Protein with an Unusual Topology. *Traffic* 4, 694–709.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.-Y., and Vierstra, R.D. (2003). The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Protein Modification System in *Arabidopsis*: ACCUMULATION OF SUMO1 AND -2 CONJUGATES IS INCREASED BY STRESS. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6862–6872.
- Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, 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.
- Laguet, N., Rahm, N., Sobhian, B., Chable-Bessia, C., Münch, J., Snoeck, J., Sauter, D., Switzer, W.M., Heneine, W., Kirchhoff, F., et al. (2012). Evolutionary and Functional Analyses of the Interaction between the Myeloid Restriction Factor SAMHD1 and the Lentiviral Vpx Protein. *Cell Host & Microbe* 11, 205–217.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature Immunology* 13, 223–228.
- Lalezari, J.P. (2003). Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America. *The New England Journal of Medicine* 11.
- Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de Thé H (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol.* May;10(5):547-55.
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R.B., and Bex, F. (2005). Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF- κ B Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology* 25, 10391–10406.

- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F., and Brahe, C. (1997). SMT3A, a Human Homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 Gene, Maps to Chromosome 21qter and Defines a Novel Gene Family. *Genomics* 40, 362–366.
- Le Tortorec, A., Willey, S., and Neil, S.J.D. (2011). Antiviral Inhibition of Enveloped Virus Release by Tetherin/BST-2: Action and Counteraction. *Viruses* 3, 520–540.
- Lebon, P., Badoual, J., Ponsot, G., Goutières, F., Hémeury-Cukier, F., and Aicardi, J. (1988). Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy. *Journal of the Neurological Sciences* 84, 201–208.
- Lebon, P., Meritet, J.F., Krivine, A., and Rozenberg, F. (2002). Interferon and Aicardi-Goutières syndrome. *European Journal of Paediatric Neurology* 6, A47–A53.
- Lee, E.J., Seo, J.H., Park, J.-H., Vo, T.T.L., and An, S. (2017). Its deoxynucleotide promotes cancer cell. *Oncotarget* 13.
- Lenzi, G.M., Domaoal, R.A., Kim, D.-H., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2014). Kinetic variations between reverse transcriptases of viral protein X coding and noncoding lentiviruses. *Retrovirology* 11.
- Lenzi, G.M., Domaoal, R.A., Kim, D.-H., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2015). Mechanistic and Kinetic Differences between Reverse Transcriptases of Vpx Coding and Non-coding Lentiviruses. *Journal of Biological Chemistry* 290, 30078–30086.
- Lewin-Smith, M.R., Klassen, M.K., Frankel, S.S., and Nelson, A.M. (1998). Pathology of human immunodeficiency virus infection: Infectious conditions. *Annals of Diagnostic Pathology* 2, 181–194.
- Lewis, P.F., and Emerman, M. (1994). Passage through Mitosis Is Required for Oncoretroviruses but Not for the Human Immunodeficiency Virus. *J. VIROL.* 7.
- Li N, Zhang W, Cao X (2000). Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells. *Immunol Lett.* 2000 Nov 1;74(3):221-4.
- Li, X.H., and Gaynor, R.B. (2000). Mechanisms of NF- κ B Activation by the HTLV Type 1 Tax Protein. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16, 1583–1590.
- Li, Z., Wu, S., Wang, J., Li, W., Lin, Y., Ji, C., Xue, J., and Chen, J. (2012). Evaluation of the interactions of HIV-1 integrase with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *International Journal of Molecular Medicine* 30, 1053–1060.
- Liang, Y.-C., Lee, C.-C., Yao, Y.-L., Lai, C.-C., Schmitz, M.L., and Yang, W.-M. (2016). SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Scientific Reports* 6.
- Lilly, F. (1967). Susceptibility to Two Strains of Friend Leukemia Virus in Mice. *Science* 155, 461–462.
- Lim ES, Emerman M (2011). HIV: Going for the watchman. *Nature.* Jun 29;474(7353):587-8.
- Lindahl, T., Barnes, D.E., Yang, Y.-G., and Robins, P. (2009). Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease: Figure 1. *Biochemical Society Transactions* 37, 535–538.
- Liu, Y., Zhao, D., Qiu, F., Zhang, L.-L., Liu, S.-K., Li, Y.-Y., Liu, M.-T., Wu, D., Wang, J.-X., Ding, X.-Q., et al. (2017). Manipulating PML SUMOylation via Silencing UBC9 and RNF4 Regulates Cardiac Fibrosis. *Molecular Therapy* 25, 666–678.
- 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.
- Lukic, Z., Goff, S.P., Campbell, E.M., and Arriagada, G. (2013). Role of SUMO-1 and SUMO interacting motifs in rhesus TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology* 10, 10.

- Madani, N., and Kabat, D. (1998). An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *J. VIROL.* 72, 5.
- Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougai, S., Clapham, P.R., and We, R.A. (1986). Gene Encodes the AIDS Virus Receptor Expressed in the Immune System and the Brain. 16.
- Madu, I.G., Li, S., Li, B., Li, H., Chang, T., Li, Y.-J., Vega, R., Rossi, J., Yee, J.-K., Zaia, J., et al. (2016). A Novel Class of HIV-1 Antiviral Agents Targeting HIV via a SUMOylation-Dependent Mechanism. *Scientific Reports* 5.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2. *Cell* 88, 97–107.
- Mahalingam S, Van Tine B, Santiago ML, Gao F, Shaw GM, Hahn BH (2001). Functional analysis of the simian immunodeficiency virus Vpx protein: identification of packaging determinants and a novel nuclear targeting domain. *J Virol.* Jan;75(1):362-74.
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F.R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A.L., Mellors, J.W., Kearney, M.F., et al. (2014). Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345, 179–183.
- Malim, M.H., and Bieniasz, P.D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006940–a006940.
- 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. 424, 5.
- Marechal, V., Prevost, M.-C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.-M., and Schwartz, O. (2001). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *Journal of Virology* 75, 11166–11177.
- Mariani, C., Desdoutis, M., Favard, C., Benaroch, P., and Muriaux, D.M. (2014). Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4+ T cells and macrophages. *Frontiers in Microbiology* 5.
- van Marle, G., Church, D.L., van der Meer, F., and Gill, M.J. (2018). Combating the HIV reservoirs. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1–14.
- Martinez-Steele, E., Awasana, A.A., Corrah, T., Sabally, S., van der Sande, M., Jaye, A., Togun, T., Sarge-Njie, R., McConkey, S.J., Whittle, H., et al. (2007). Is HIV-2- induced AIDS different from HIV-1-associated AIDS? Data from a West African clinic: *AIDS* 21, 317–324.
- Martins, W.C., Tasca, C.I., and Cimarosti, H. (2016). Battling Alzheimer's Disease: Targeting SUMOylation-Mediated Pathways. *Neurochemical Research* 41, 568–578.
- Mathias, S., Scott, A., Kazazian, H., Boeke, J., and Gabriel, A. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808–1810.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2010). Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Molecular Cell* 39, 641–652.
- Matreyek, K.A., and Engelman, A. (2011). The Requirement for Nucleoporin NUP153 during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is Determined by the Viral Capsid. *Journal of Virology* 85, 7818–7827.
- Mattoscio, D. (2013). Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson. *World Journal of Virology* 2, 79.

- Matunis, M.J. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* 135, 1457–1470.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *The Journal of Cell Biology* 159, 441–452.
- McNatt, M.W., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2013). Vpu Binds Directly to Tetherin and Displaces It from Nascent Virions. *PLoS Pathogens* 9, e1003299.
- Meluh, P.B., and Koshland, D. (1995). *cerevisiae* Encodes a Centromere Protein with Homology to the Mammalian Centromere Protein. *Molecular Biology of the Cell* 6, 15.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent Modification of p73 α by SUMO-1: Two-Hybrid Screening With p73 Identifies Novel SUMO-1-Interacting Proteins And A SUMO-1 Interacting Motif. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36316–36323.
- 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, e1000450.
- Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., St Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., and Broder, S. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7096–7100.
- Miyagi, E., Opi, S., Takeuchi, H., Khan, M., Goila-Gaur, R., Kao, S., and Strebel, K. (2007). Enzymatically Active APOBEC3G Is Required for Efficient Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 81, 13346–13353.
- 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.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perković, M., Löwer, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G.G., and Münk, C. (2006). APOBEC3 Proteins Inhibit Human LINE-1 Retrotransposition. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22161–22172.
- Mun, M.-J., Kim, J.-H., Choi, J.-Y., Kim, M.-S., Jang, W.-C., Lee, J.J., Eun, Y.L., Kwak, S.-J., Kim, K.W., and Lee, S.B. (2016). Polymorphisms of small ubiquitin-related modifier genes are associated with risk of Alzheimer's disease in Korean: A case-control study. *Journal of the Neurological Sciences* 364, 122–127.
- Naif, H.M. (2013). Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports* 5, 6.
- Nasr, R. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* 107, 4021–4029.
- Nathans, R., Cao, H., Sharova, N., Ali, A., Sharkey, M., Stranska, R., Stevenson, M., and Rana, T.M. (2008). Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif. *Nature Biotechnology* 26, 1187–1192.
- Ndour, M., Sow, P., Coll-Seck, A.M., Badiane, S., Ndour, C., Diakhate, N., Diop, B., Faye, M., Soumare, M., Diouf, G., et al. (2000). AIDS caused by HIV1 and HIV2 infection: are there clinical differences? Results of AIDS surveillance 1986-97 at Fann Hospital in Dakar, Senegal. *Tropical Medicine and International Health* 5, 687–691.
- 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, e39.
- 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.
- Nepveu-Traversy, M.-É., and Berthou, L. (2014). The conserved sumoylation consensus site in TRIM5 α modulates its immune activation functions. *Virus Research* 184, 30–38.

- Nepveu-Traversy, M.-É., Demogines, A., Fricke, T., Plourde, M.B., Riopel, K., Veillette, M., Diaz-Griffero, F., Sawyer, S.L., and Berthoux, L. (2016). A putative SUMO interacting motif in the B30.2/SPRY domain of rhesus macaque TRIM5 α important for NF- κ B/AP-1 signaling and HIV-1 restriction. *Heliyon* 2, e00056.
- Newman, E.N.C., Holmes, R.K., Craig, H.M., Klein, K.C., Lingappa, J.R., Malim, M.H., and Sheehy, A.M. (2005). Antiviral Function of APOBEC3G Can Be Dissociated from Cytidine Deaminase Activity. *Current Biology* 15, 166–170.
- Nguyen, B.-Y.T., Isaacs, R.D., Teppler, H., Leavitt, R.Y., Sklar, P., Iwamoto, M., Wenning, L.A., Miller, M.D., Chen, J., Kemp, R., et al. (2011). Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium: Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1222, 83–89.
- Nguyen, T., Lindner, R., Tedeschi, A., Forsberg, K., Green, A., Wuttke, A., Gaub, P., and Di Giovanni, S. (2009). NFAT-3 Is a Transcriptional Repressor of the Growth-associated Protein 43 during Neuronal Maturation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 18816–18823.
- 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* 101, 13324–13328.
- Nisole, S., Stoye, J.P., and Saïb, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nature Reviews Microbiology* 3, 799–808.
- Noguchi, C., Ishino, H., Tsuge, M., Fujimoto, Y., Imamura, M., Takahashi, S., and Chayama, K. (2005). G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 41, 626–633.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide Reductases. 29.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Macallan, D.C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis: Comparisons between HIV-1 and HIV-2 infection. *Reviews in Medical Virology* 23, 221–240.
- Oberstrass, F.C., Lee, A., Stefl, R., Janis, M., Chanfreau, G., and Allain, F.H.-T. (2006). Shape-specific recognition in the structure of the Vts1p SAM domain with RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 160–167.
- Ocwieja, K.E., Brady, T.L., Ronen, K., Huegel, A., Roth, S.L., Schaller, T., James, L.C., Towers, G.J., Young, J.A.T., Chanda, S.K., et al. (2011). HIV Integration Targeting: A Pathway Involving Transportin-3 and the Nuclear Pore Protein RanBP2. *PLoS Pathogens* 7, e1001313.
- OhAinle, M., Kerns, J.A., Li, M.M.H., Malik, H.S., and Emerman, M. (2008). Antiretroelement Activity of APOBEC3H Was Lost Twice in Recent Human Evolution. *Cell Host & Microbe* 4, 249–259.
- ONUSIDA. Fiche d'information 2017.
- Otteken, A., Earl, P.L., and Moss, B. (1996). Folding, Assembly, and Intracellular Trafficking of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Analyzed with Monoclonal Antibodies Recognizing Maturational Intermediates. *J. VIROL.* 70, 9.
- Palella, F.J. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *The New England Journal of Medicine* 8.
- Pancio HA, Vander Heyden N, Ratner L (2000). The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. *J Virol.* Jul;74(13):6162-7.
- Pauls, E., Jimenez, E., Ruiz, A., Permanyer, M., Ballana, E., Costa, H., Nascimento, R., Parkhouse, R.M., Pena, R., Riveiro-Munoz, E., et al. (2013). Restriction of HIV-1 Replication in Primary Macrophages by IL-12 and IL-18 through the Upregulation of SAMHD1. *The Journal of Immunology* 190, 4736–4741.

- Pauls, E., Badia, R., Torres-Torronteras, J., Ruiz, A., Permanyer, M., Riveira-Muñoz, E., Clotet, B., Marti, R., Ballana, E., and Esté, J.A. (2014). Palbociclib, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinase4/6, blocks HIV-1 reverse transcription through the control of sterile α motif and HD domain-containing protein-1 (SAMHD1) activity: *AIDS* 28, 2213–2222.
- Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Jun;10(3):392-9.
- Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J. (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology* 295, 1139–1162.
- Pereira, E.A., and daSilva, L.L.P. (2016). HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking: Manipulation of Protein Sorting Machinery by HIV-1 Nef. *Traffic* 17, 976–996.
- Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T., Yang, A., Cowan, S., and Bieniasz, P.D. (2005). Human Tripartite Motif 5 Domains Responsible for Retrovirus Restriction Activity and Specificity. *Journal of Virology* 79, 8969–8978.
- 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.
- Perry, J.J.P., Tainer, J.A., and Boddy, M.N. (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 201–208.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F.A., Uchil, P.D., Chatel, L., et al. (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361–365.
- Pham, H.T., and Mesplede, T. (2018). The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies. *Drugs in Context* 7, 1–14.
- Phanstiel, D.H., Van Bortle, K., Spacek, D., Hess, G.T., Shamim, M.S., Machol, I., Love, M.I., Aiden, E.L., Bassik, M.C., and Snyder, M.P. (2017). Static and Dynamic DNA Loops form AP-1-Bound Activation Hubs during Macrophage Development. *Molecular Cell* 67, 1037-1048.e6.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The Nucleoporin RanBP2 Has SUMO1 E3 Ligase Activity. *Cell* 108, 109–120.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Körner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 264–269.
- Pogliaghi M, Papagno L, Lambert S, Calin R, Calvez V, Katlama C, Autran B (2014). The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib blocks in-vitro HIV-1 production by primary CD4+ T cells from HIV-1 infected patients. *AIDS*. 2014 Jan 14;28(2):278-81.
- Pollard, V.W., and Malim, M.H. (1998). THE HIV-1 REV PROTEIN. *Annual Review of Microbiology* 52, 491–532.
- Ponting, C.P. (1995). SAM: A novel motif in yeast sterile and *drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Science* 4, 1928–1930.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Travers, K.U., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (1999). Lower Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 Viral Load Reflects the Difference in Pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. 6.
- Portilho, D.M., Fernandez, J., Ringeard, M., Machado, A.K., Boulay, A., Mayer, M., Müller-Trutwin, M., Beignon, A.-S., Kirchhoff, F., Nisole, S., et al. (2016). Endogenous TRIM5 α Function Is Regulated by

- SUMOylation and Nuclear Sequestration for Efficient Innate Sensing in Dendritic Cells. *Cell Reports* 14, 355–369.
- Poulsen, S.L., Hansen, R.K., Wagner, S.A., van Cuijk, L., van Belle, G.J., Streicher, W., Wikström, M., Choudhary, C., Houtsmuller, A.B., Marteiijn, J.A., et al. (2013). RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *The Journal of Cell Biology* 201, 797–807.
- Preston, B.D., POIESZ, B.J., and LOEB, L.A. (1988). Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 242, 5.
- Price, A.J., Marzetta, F., Lammers, M., Ylinen, L.M.J., Schaller, T., Wilson, S.J., Towers, G.J., and James, L.C. (2009). Active site remodeling switches HIV specificity of antiretroviral TRIMCyp. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 1036–1042.
- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J.P., Tainer, J.A., McGowan, C.H., and Boddy, M.N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *The EMBO Journal* 26, 4089–4101.
- Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The Many Faces of SAM. *Science Signaling* 2005, re7–re7.
- Qiu, J., Qian, Y., Frank, P., Wintersberger, U., and Shen, B. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* RNase H(35) Functions in RNA Primer Removal during Lagging-Strand DNA Synthesis, Most Efficiently in Cooperation with Rad27 Nuclease. *Molecular and Cellular Biology* 19, 8361–8371.
- Rampazzo, C., Miazzi, C., Franzolin, E., Pontarin, G., Ferraro, P., Frangini, M., Reichard, P., and Bianchi, V. (2010). Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 703, 2–10.
- Rhee, S.-Y., Sankaran, K., Varghese, V., Winters, M.A., Hurt, C.B., Eron, J.J., Parkin, N., Holmes, S.P., Holodniy, M., and Shafer, R.W. (2016). HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation. *Journal of Virology* 90, 6058–6070.
- Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nature Genetics* 41, 829–832.
- Roberts, J., Bebenek, K., and Kunkel, T. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171–1173.
- Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., et al. (2015). HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526, 212–217.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.-Y., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., et al. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nature Medicine* 20, 936–941.
- Sahin, U., Ferhi, O., Carnec, X., Zamborlini, A., Peres, L., Jollivet, F., Vitaliano-Prunier, A., de Thé, H., and Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Interferon controls SUMO availability via the Lin28 and let-7 axis to impede virus replication. *Nature Communications* 5.
- Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6252–6258.
- 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.
- Sawyer, S.L., Wu, L.I., Emerman, M., and Malik, H.S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 2832–2837.

- Sayah, D.M., Sokolskaja, E., Berthoux, L., and Luban, J. (2004). Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-. *430*, 5.
- Schaller, T., Pollpeter, D., Apolonia, L., Goujon, C., and Malim, M.H. (2014). Nuclear import of SAMHD1 is mediated by a classical karyopherin α/β 1 dependent pathway and confers sensitivity to VpxMAC induced ubiquitination and proteasomal degradation. *Retrovirology* *11*, 29.
- Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 2872–2877.
- Schmidt, S., Schenkova, K., Adam, T., Erikson, E., Lehmann-Koch, J., Sertel, S., Verhasselt, B., Fackler, O.T., Lasitschka, F., and Keppler, O.T. (2015). SAMHD1's protein expression profile in humans. *Journal of Leukocyte Biology* *98*, 5–14.
- Schröfelbauer B, Chen D, Landau NR (2004). A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3927-32.
- Schultz J, Ponting CP, Hofmann K, Bork P (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci*. Jan;6(1):249-53.
- Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 1996 Mar;2(3):338-42.
- Schwefel, D., Groom, H.C.T., Boucherit, V.C., Christodoulou, E., Walker, P.A., Stoye, J.P., Bishop, K.N., and Taylor, I.A. (2014). Structural basis of lentiviral subversion of a cellular protein degradation pathway. *Nature* *505*, 234–238.
- Schwefel, D., Boucherit, V.C., Christodoulou, E., Walker, P.A., Stoye, J.P., Bishop, K.N., and Taylor, I.A. (2015). Molecular Determinants for Recognition of Divergent SAMHD1 Proteins by the Lentiviral Accessory Protein Vpx. *Cell Host & Microbe* *17*, 489–499.
- Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2017). SUMO and the robustness of cancer. *Nature Reviews Cancer* *17*, 184–197.
- Seissler, T., Marquet, R., and Paillart, J.-C. (2017). Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins. *Viruses* *9*, 322.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* *1*, a006841–a006841.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):646-50.
- Shi, J., Zhou, J., Shah, V.B., Aiken, C., and Whitby, K. (2011). Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection by Virus Capsid Destabilization. *Journal of Virology* *85*, 542–549.
- 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. *Nature Medicine* *9*, 727–728.
- de Silva, S., Hoy, H., Hake, T.S., Wong, H.K., Porcu, P., and Wu, L. (2013). Promoter Methylation Regulates SAMHD1 Gene Expression in Human CD4 + T Cells. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 9284–9292.
- Simon, V., Bloch, N., and Landau, N.R. (2015). Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nature Immunology* *16*, 546–553.
- Sommer, A.F.R., Rivière, L., Qu, B., Schott, K., Riess, M., Ni, Y., Shepard, C., Schnellbacher, E., Finkernagel, M., Himmelsbach, K., et al. (2016). Restrictive influence of SAMHD1 on Hepatitis B Virus life cycle. *Scientific Reports* *6*.

- Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 14373–14378.
- Sood, C., Marin, M., Chande, A., Pizzato, M., and Melikyan, G.B. (2017). SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 292, 6014–6026.
- Spach DH, Wood BR, Karpenko A, Unruh KT, Kinney RG, Roscoe C, Nelson J (2016). Creating a National HIV Curriculum. *J Assoc Nurses AIDS Care*. 2016 May-Jun;27(3):261-73.
- Sriramachandran, A.M., and Dohmen, R.J. (2014). SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 75–85.
- Srivastava, S., Swanson, S.K., Manel, N., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2008). Lentiviral Vpx Accessory Factor Targets VprBP/DCAF1 Substrate Adaptor for Cullin 4 E3 Ubiquitin Ligase to Enable Macrophage Infection. *PLoS Pathogens* 4, e1000059.
- St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S.M., Coleman, C.M., Hoy, H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., and Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4+ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. *Retrovirology* 9, 105.
- St. Gelais, C., de Silva, S., Hach, J.C., White, T.E., Diaz-Griffero, F., Yount, J.S., and Wu, L. (2014). Identification of Cellular Proteins Interacting with the Retroviral Restriction Factor SAMHD1. *Journal of Virology* 88, 5834–5844.
- Stehmeier, P., and Muller, S. (2009). Phospho-Regulated SUMO Interaction Modules Connect the SUMO System to CK2 Signaling. *Molecular Cell* 33, 400–409.
- Steinman RM (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.
- Stoye, J.P., and Yap, M.W. (2008). Chance favors a prepared genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3177–3178.
- Strebel, K., Klimkait, T., and Martin, M. (1988). A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241, 1221–1223.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5a restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *427*, 6.
- 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 restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5514–5519.
- Su, H.-L., and Li, S.S.-L. (2002). Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296, 65–73.
- Sun, H., Levenson, J.D., and Hunter, T. (2007). Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *The EMBO Journal* 26, 4102–4112.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh-e, A., Yasuda, H., and Kikuchi, Y. (2001). Yeast Ull1/Siz1 Is a Novel SUMO1/Smt3 Ligase for Septin Components and Functions as an Adaptor between Conjugating Enzyme and Substrates. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48973–48977.
- Tang, C., Ji, X., Wu, L., and Xiong, Y. (2015). Impaired dNTPase Activity of SAMHD1 by Phosphomimetic Mutation of Thr-592. *Journal of Biological Chemistry* 290, 26352–26359.

- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M.P., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 Are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35368–35374.
- Tatham, M.H., Geoffroy, M.-C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., and Hay, R.T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature Cell Biology* 10, 538–546.
- Taylor, B.S., Sobieszczyk, M.E., McCutchan, F.E., and Hammer, S.M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *New England Journal of Medicine* 358, 1590–1602.
- Tedbury, P.R., and Sarafianos, S.G. (2017). Exposing HIV's weaknesses. *Journal of Biological Chemistry* 292, 6027–6028.
- Thompson M, Lalezari JP, Kaplan R, Pinedo Y, Pena OAS, Cahn P, Stock DA, Joshi SR, Hanna GJ, Lataillade M (2017). Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug fostemsavir in antiretroviral-experienced subjects: week 48 analysis of AI438011, a Phase IIb, randomized controlled trial. *Antivir Ther.* 2017;22(3):215-223.
- Torimiro, J.N., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Kim, J., Carr, J.K., Carrington, M., Sawitzke, J., Burke, D.S., Wolfe, N.D., Dean, M., et al. (2009). A rare null allele potentially encoding a dominant-negative TRIM5 α protein in Baka pygmies. *Virology* 391, 140–147.
- Towers, G., Bock, M., Martin, S., Takeuchi, Y., Stoye, J.P., and Danos, O. (2000). A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12295–12299.
- Towers, G., Collins, M., and Takeuchi, Y. (2002). Abrogation of Ref1 Retrovirus Restriction in Human Cells. *Journal of Virology* 76, 2548–2550.
- Towers, G.J., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Luban, J., and Bieniasz, P.D. (2003). Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nature Medicine* 9, 1138–1143.
- Turelli, P. (2004). Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829–1829.
- 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.
- Vandegraaff, N., and Engelman, A. (2007). Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 9.
- Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry* 81, 323–357.
- Venkatesh, S., and Bieniasz, P.D. (2013). Mechanism of HIV-1 Virion Entrapment by Tetherin. *PLoS Pathogens* 9, e1003483.
- Virgen, C.A., Kratovac, Z., Bieniasz, P.D., and Hatzioannou, T. (2008). Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3563–3568.
- Vorontsov, I.I., Minasov, G., Kiryukhina, O., Brunzelle, J.S., Shuvalova, L., and Anderson, W.F. (2011). Characterization of the Deoxynucleotide Triphosphate Triphosphohydrolase (dNTPase) Activity of the EF1143 Protein from *Enterococcus faecalis* and Crystal Structure of the Activator-Substrate Complex. *Journal of Biological Chemistry* 286, 33158–33166.
- Vyas, R., Kumar, R., Clermont, F., Helfricht, A., Kalev, P., Sotiropoulou, P., Hendriks, I.A., Radaelli, E., Hocheppied, T., Blanpain, C., et al. (2013). RNF4 is required for DNA double-strand break repair in vivo. *Cell Death & Differentiation* 20, 490–502.

- Wagner, T.A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C.Y.K., Larsen, B.B., Styrchak, S., Huang, H.C., Edlefsen, P.T., Mullins, J.I., and Frenkel, L.M. (2014). Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 345, 570–573.
- Wang, J., Lu, F., Shen, X.-Y., Wu, Y., and Zhao, L. (2014). SAMHD1 is down regulated in lung cancer by methylation and inhibits tumor cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455, 229–233.
- Wei W, Guo H, Han X, Liu X, Zhou X, Zhang W, Yu XF (2012). A novel DCAF1-binding motif required for Vpx-mediated degradation of nuclear SAMHD1 and Vpr-induced G2 arrest. *Cell Microbiol. Nov;14(11):1745-56.*
- Welbourn, S., Dutta, S.M., Semmes, O.J., and Strebel, K. (2013). Restriction of Virus Infection but Not Catalytic dNTPase Activity Is Regulated by Phosphorylation of SAMHD1. *Journal of Virology* 87, 11516–11524.
- White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2013a). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* 436, 81–90.
- White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013b). The Retroviral Restriction Ability of SAMHD1, but Not Its Deoxynucleotide Triphosphohydrolase Activity, Is Regulated by Phosphorylation. *Cell Host & Microbe* 13, 441–451.
- White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Han, K., Sawyer, S.L., Kim, B., and Diaz-Griffero, F. (2016). Modulation of LINE-1 retrotransposition by a human SAMHD1 polymorphism. *Virology Reports* 6, 53–60.
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006866–a006866.
- Wilson, S.J., Webb, B.L.J., Ylinen, L.M.J., Verschoor, E., Heeney, J.L., and Towers, G.J. (2008). Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3557–3562.
- Xie, Y., Kerscher, O., Kroetz, M.B., McConchie, H.F., Sung, P., and Hochstrasser, M. (2007). The Yeast Hex3{middle dot}Slx8 Heterodimer Is a Ubiquitin Ligase Stimulated by Substrate Sumoylation. *Journal of Biological Chemistry* 282, 34176–34184.
- Xu, H., Svarovskaia, E.S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M.A., Strebel, K., and Pathak, V.K. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 5652–5657.
- Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F., and Osumi, T. (2004). The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor γ is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes to Cells* 9, 1017–1029.
- Yan, J., Kaur, S., DeLucia, M., Hao, C., Mehrens, J., Wang, C., Golczak, M., Palczewski, K., Gronenborn, A.M., Ahn, J., et al. (2013). Tetramerization of SAMHD1 Is Required for Biological Activity and Inhibition of HIV Infection. *Journal of Biological Chemistry* 288, 10406–10417.
- Yan, J., Hao, C., DeLucia, M., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Ahn, J., and Skowronski, J. (2015). CyclinA2-Cyclin-dependent Kinase Regulates SAMHD1 Protein Phosphohydrolase Domain. *Journal of Biological Chemistry* 290, 13279–13292.
- Yang YG, Lindahl T, Barnes DE (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell. Nov 30;131(5):873-86.*
- Yap, M.W., Colbeck, E., Ellis, S.A., and Stoye, J.P. (2014). Evolution of the Retroviral Restriction Gene Fv1: Inhibition of Non-MLV Retroviruses. *PLoS Pathogens* 10, e1003968.
- Yeh, E.T.H., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1–14.

- Yu, Q., König, R., Pillai, S., Chiles, K., Kearney, M., Palmer, S., Richman, D., Coffin, J.M., and Landau, N.R. (2004). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 435–442.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.-H., and Essex, M. (1992). The Matrix Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Required for Incorporation of Viral Envelope Protein into Mature Virions. *J. VIROL.* 66, 6.
- Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*. 2003 Nov 7;302(5647):1056-60.
- Yueh, A., Leung, J., Bhattacharyya, S., Perrone, L.A., de los Santos, K., Pu, S. -y., and Goff, S.P. (2006). Interaction of Moloney Murine Leukemia Virus Capsid with Ubc9 and PIASy Mediates SUMO-1 Addition Required Early in Infection. *Journal of Virology* 80, 342–352.
- Zamborlini, A., Lehmann-Che, J., Clave, E., Giron, M.-L., Tobaly-Tapiero, J., Roingard, P., Emiliani, S., Toubert, A., de Thé, H., and Saïb, A. (2007). Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology* 4, 63.
- Zamborlini, A., Coiffic, A., Beauclair, G., Delelis, O., Paris, J., Koh, Y., Magne, F., Giron, M.-L., Tobaly-Tapiero, J., Deprez, E., et al. (2011). Impairment of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase SUMOylation Correlates with an Early Replication Defect. *Journal of Biological Chemistry* 286, 21013–21022.
- 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, X., Zhou, T., Yang, J., Lin, Y., Shi, J., Zhang, X., Frabutt, D.A., Zeng, X., Li, S., Venta, P.J., et al. (2017). Identification of SERINC5-001 as the Predominant Spliced Isoform for HIV-1 Restriction. *Journal of Virology* 91, e00137-17.
- Zhang, Z., Klatt, A., Gilmour, D.S., and Henderson, A.J. (2007). Negative Elongation Factor NELF Represses Human Immunodeficiency Virus Transcription by Pausing the RNA Polymerase II Complex. *Journal of Biological Chemistry* 282, 16981–16988.
- Zhao, G., Ke, D., Vu, T., Ahn, J., Shah, V.B., Yang, R., Aiken, C., Charlton, L.M., Gronenborn, A.M., and Zhang, P. (2011). Rhesus TRIM5 α Disrupts the HIV-1 Capsid at the Inter-Hexamer Interfaces. *PLoS Pathogens* 7, e1002009.
- Zhao, K., Du, J., Han, X., Goodier, J.L., Li, P., Zhou, X., Wei, W., Evans, S.L., Li, L., Zhang, W., et al. (2013). Modulation of LINE-1 and Alu/SVA Retrotransposition by Aicardi-Goutières Syndrome-Related SAMHD1. *Cell Reports* 4, 1108–1115.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K., and Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE* 9, e78644.
- Zhu C, Gao W, Zhao K, Qin X, Zhang Y, Peng X, Zhang L, Dong Y, Zhang W, Li P, Wei W, Gong Y, Yu XF (2013). Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nat Commun.*;4:2722.
- Zimmermann, P., Manz, B., Haller, O., Schwemmler, M., and Kochs, G. (2011). The Viral Nucleoprotein Determines Mx Sensitivity of Influenza A Viruses. *Journal of Virology* 85, 8133–8140.
- Zuo, T., Liu, D., Lv, W., Wang, X., Wang, J., Lv, M., Huang, W., Wu, J., Zhang, H., Jin, H., et al. (2012). Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Targeting the Interaction between Vif and ElonginC. *Journal of Virology* 86, 5497–5507.

