



HAL
open science

Inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par la protéine Daxx

Sarah Maillet

► **To cite this version:**

Sarah Maillet. Inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par la protéine Daxx. Virologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT062 . tel-03211165

HAL Id: tel-03211165

<https://theses.hal.science/tel-03211165v1>

Submitted on 28 Apr 2021

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier IRIM – UMR9004

Inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par la protéine Daxx

Présentée par Sarah MAILLET

Le 2 novembre 2020

Sous la direction du Dr. Sébastien NISOLE

Devant le jury composé de

Pr. Uriel HAZAN, Professeur des Universités, ENS Paris Saclay, Paris

Dr. Florence MARGOTTIN-GOGUET, Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin, Paris

Dr. Patrick LOMONTE, Directeur de Recherche CNRS, Institut NeuroMyoGène, Lyon

Dr. Caroline GOUJON, Chargée de recherche INSERM, IRIM, Montpellier

Dr. Sébastien NISOLE, Chargé de recherche INSERM, IRIM, Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par la protéine Daxx

Daxx (Death domain-associated protein 6), est une protéine multifonctionnelle exprimée de façon ubiquitaire majoritairement dans le noyau des cellules, où il se trouve associé aux corps nucléaires formés par la protéine PML. En 2015, l'équipe a identifié Daxx comme un facteur de résistance à certains rétrovirus, dont le VIH-1. Daxx cible plus précisément la transcription inverse du VIH-1, une étape essentielle et spécifique du cycle de réplication des rétrovirus, au cours de laquelle le génome viral sous forme ARN est converti en un ADN double brin capable de s'intégrer au génome de l'hôte. Les travaux que nous avons entrepris avaient pour but d'élucider le mécanisme de restriction imposé par Daxx, notamment en identifiant les partenaires impliqués dans cette activité antivirale. Nous avons d'abord montré que la région SIM localisée en C-terminale de Daxx, un domaine qui lui permet d'interagir avec des protéines SUMOylées, était nécessaire à sa fonction inhibitrice. Après différentes mises au point, un criblé protéomique complété d'expériences d'immunoprécipitation ont montré que Daxx s'associe aux particules virales entrantes par l'intermédiaire d'une interaction avec la cyclophiline A dépendante de la région SIM de Daxx. Cette interaction est à l'origine de la formation d'un complexe multiprotéique également constitué de TRIM5 α , TRIM34 et TNPO3. Sachant que certains de ces facteurs influencent la stabilité de la capsid d'une part, et que la transcription inverse est étroitement liée à l'étape de décapsidation, nous nous sommes interrogés sur l'implication de Daxx dans la stabilité des capsides. Nous avons ainsi montré que Daxx stabilise les capsides virales de manière SIM-dépendante. Nos résultats suggèrent que Daxx, en s'associant à la CypA liée aux capsides entrantes par l'intermédiaire de son motif SIM, recrute d'autres partenaires comme TRIM5 α , TRIM34 ou TNPO3, ce qui provoque la stabilisation des capsides et empêche la décapsidation et la transcription inverse.

Daxx-mediated inhibition of HIV-1 reverse transcription

Daxx is a multifunctional ubiquitously expressed protein, mainly found in the nucleus, where it associates with nuclear structures called PML nuclear bodies. In a previous study, the team showed that antiviral effect of PML was not direct and identified Daxx as a novel restriction factor which interferes with an early step of HIV-1 and other retroviruses replication cycle. Daxx indeed targets the reverse transcription, an essential step responsible for the RNA viral genome conversion in a double stranded DNA that can integrate in the cellular host genome. In order to decipher the mechanism underlying Daxx-mediated inhibition of HIV-1 reverse transcription, we sought to identify Daxx's partners involve in this antiviral activity. We first showed that the C-terminus domain of Daxx called SIM, for SUMO-interacting motif, was required for its antiviral activity. A proteomic screen combined with biochemical approaches showed that Daxx associates with incoming viral cores in a SIM-dependant interaction with cyclophilin A (CypA). Daxx is found in a multiprotein complex associated with incoming viral particles and containing TRIM5 α , TRIM34 and TNPO3. Knowing that some of these factors influence HIV-1 core stability, we investigated the effect of Daxx on the fate of incoming viral particles, and showed that Daxx interferes HIV-1 uncoating in a SIM-dependant manner. Altogether, our findings suggest that Daxx interacts with CypA associated with viral capsids to recruit a multiprotein complex containing TRIM5 α , TRIM34 and TNPO3 in order to stabilize the viral cores thus preventing uncoating and reverse transcription.

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier le Dr. Caroline Goujon et le Pr. Uriel Hazan d'avoir accepté d'évaluer et de discuter mes travaux de thèse. Je remercie plus particulièrement mes rapporteurs, le Dr. Florence Margottin-Goguet et le Dr. Patrick Lomonte, qui ont consacré une partie de leur temps à lire et commenter mon manuscrit. Un grand merci au Dr. Sara Salinas pour l'écoute, les encouragements et les conseils qu'elle a pu me donner lors des comités de suivi individuel.

Je remercie le Dr. Jean-Michel Mesnard d'avoir accepté que je réalise ma thèse au sein de son institut, l'IRIM. Vous y faites régner un climat sérieux, dynamique et serein, où tout est réuni pour faire de la bonne science. Et grâce à vous, nous partageons entre collègues des moments inoubliables !

Je remercie également les financeurs qui ont rendu tous ces travaux possibles, en particulier l'ANRS qui m'a soutenue pendant ces trois ans de thèse.

Alors je m'excuse par avance pour ces remerciements qui ne reflèteront peut-être pas ce qui se passe au fond de moi. Ces quelques mots risquent de ne pas être à la hauteur de mes plus profondes pensées, alors j'espère seulement que les moments que nous aurons partagés ensemble ces dernières années vous montreront toute l'estime que j'ai pour chacun d'entre vous. On aura passé de bons moments tout de même !!

C'est avec beaucoup d'émotion que je remercie mon directeur de thèse, le Dr. Sébastien Nisole. J'ai du mal à trouver les mots justes pour exprimer toute ma gratitude. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné cette opportunité il y a maintenant plus de quatre ans, quelque part au milieu du labyrinthe des Saints-Pères. A l'époque, j'étais loin d'imaginer à quel point cette opportunité allait chambouler ma vie ! (Oui, carrément) Merci de m'avoir soutenu dès le début dans les recherches de financement, pendant la thèse, quand le doute pointait le bout de son nez, et jusqu'aux derniers moments, quand le stress qui m'envahissait ! Au-delà de toutes les connaissances scientifiques que j'ai pu acquérir dans ton équipe, j'ai appris tout autant de choses sur le plan humain. J'espère aujourd'hui être une docteure digne de ce nom !

Merci au Dr. Nathalie Arhel, qui m'a accueillie à bras ouverts dans sa nouvelle équipe, fraîchement débarquée à Montpellier. Merci pour tous tes conseils avisés, ton écoute et ta disponibilité. Ta bienveillance et ton sourire font régner une bonne humeur dans la golden team VTRIS.

Nathalie et Sébastien, je suis très fière d'avoir fait parti de votre équipe. Vous m'avez donné l'opportunité d'apprendre énormément de choses à vos côtés, et de rencontrer des personnes exceptionnelles. Alors pour tout ça, MERCI.

Mille mercis à la VTRIS team ! Sans vous, cette aventure montpelliéraine n'aurait pas eu la même saveur. Beaucoup de moments mémorables et de fous rires partagés avec vous.

Fabien, un vrai puits de Sciences ! Merci pour ton oreille attentive et ta bienveillance. Je me rappellerai très longtemps de tes rébus mythiques, de tous les débats que nous avons partagés, à propos de sujets aussi divers que le journal club ou la télé-réalité, et de toutes les idées un peu folles que tu peux avoir (ça en est où le projet des cellules qui parlent ?) Marie-France, je t'ai vu évoluer et prendre de l'assurance au cours de ces années de thèse. Je te souhaite encore beaucoup de courage, et le meilleur pour la suite. Je suis sûre que tu vas finir ces trois années en apothéose ! Et envoie une petite photo de ton beau gilet une fois qu'il sera terminé ! ;) Aude, on n'aura partagé que quelques jours de travail, mais je suis sûre que tu vas te plaire ici. Je souhaite que ton aventure ici soit aussi belle que la mienne :) Quentin, je te lègue mon meuble de bureau, ma paillasse, et tout ce qui va avec ! Annexe le bureau pendant qu'il n'y a personne ;) La thèse commence pour toi, tu verras que c'est une aventure pas toujours facile mais géniale ! Je te souhaite beaucoup de réussite. Ghizlane, tu as été un repère très important quand j'ai débarqué ici, comme un petit oisillon qui prend son envol pour la première fois. Je te remercie d'avoir été là. Je t'ai vu évoluer, passant du stade de jeune post-doc à celui de bientôt chercheur accompli. Je te souhaite beaucoup de succès dans tes nouvelles entreprises. Justine, ça fait un moment que tu es partie vers de nouvelles aventures, mais je me souviens encore de ta bonne humeur et ta joie de vivre. Ce soir, on prendra bien un petit Ricard en ton honneur ! Lina, j'ai entendu dire que tu avais trouvé une thèse au Canada, c'est top ! N'oublie pas ta doudoune et ton bonnet pour affronter les tempêtes de neige, on n'a pas l'habitude de ça ici !

Ma chère Célia, un petit bout de femme pleine de gentillesse et de bienveillance. Tu as toujours été présente et prêté une oreille attentive à mes petits soucis, mes doutes et mes joies. Tu m'as fait découvrir les joies du loto et pour ça, je ne te remercierai jamais assez ! Vivement la virée ardéchoise ;) Christophe, l'homme de la meute ! Je me rappelle du premier jour où je t'ai parlé. C'était à un séminaire du vendredi, 11h. On était à côté et on a papoté en attendant le début du talk. Je me suis dit que si tu étais ami avec Célia, c'est que tu devais être sympa ! Et après avoir partagé de bons apéros, je confirme :) Bref, une très belle rencontre. Je vous souhaite une vie remplie de choses merveilleuses les copains !

Je remercie aussi tous mes chers collègues de l'IRIM, qui ont rendu la vie de labo bien sympathique en partageant de bons moments en terrasse, en beer hour, ou lors de journées IRIM mémorables ! Petite dédicace à la plus belge des montpelliéraine, bisous Mathilde ! A tous mes co-thésards, je vous souhaite bon courage et beaucoup de réussite. Mélanie, Clément, Boris, Charbel, Lam, prêts pour de nouvelles aventures ? :)

Un petit mot tout particulier pour Pascale... Juliette t'avait appelé l'ange-gardien de l'IRIM, je ne trouve pas meilleure formulation ! J'ai toujours trouvé ta porte grande ouverte, et une épaule accueillante sur laquelle me reposer. Continue de veiller sur nous tous, tu vas beaucoup me manquer ! Un gros bisou télépathique à Christine aussi. Plus d'une fois tu as été d'un grand secours ! Quand je vous vois avec Pascale, j'ai l'impression de nous voir avec Juliette dans 20 ans ^^ A quand le prochain café en terrasse ?

Ma très chère Juliette ... Quelle rencontre exceptionnelle, on peut le dire ! Deux petites âmes en peine venue de Paris, qui se retrouvent un lundi 9 janvier 2017. C'est le début des étincelles ! Tu as été un vrai binôme, présente à chaque instant pour me soutenir, me faire sourire et m'épauler. C'est en partie grâce à toi que ces trois dernières années ont été facile à vivre. Et ce n'est que le début d'une longue amitié ! #jtm #tmtc

A tous mes copains du #barabiiiiiiip (je suis obligée de biper, c'est une thèse quand même !), Bast, Max, Nina, Romain, Benoit, Alexane, Loulou, David, ou de la big team (oui ce nom remonte, mais je n'ai rien oublié !) Antoine, Victor, Amélie, Daphné, Edouard, Diane ... Je ne sais pas si vous lirez ça un jour, mais sachez que même si nous étions loin des yeux ces dernières années, vous êtes toujours restés tout près de mon cœur ! Vous êtes tous inoubliables, tout comme les moments que nous avons partagés. Je me languis de vous retrouver et de vivre encore plein de grands moments, vous me manquez tellement ! Cœur avec les doigts <3

Léa, Gaëlle, vous avez toujours été présentes, à porté de téléphone, pour papoter et me sortir un peu la tête du quotidien. Léa, notre amitié remonte maintenant à pfiou ... Même pas assez de doigts pour compter ! Et malgré tout rien ne change, et ça c'est un cadeau très précieux. Lady Gaga, toujours là pour partager d'excellents moments. On forme un trinôme de choc ! Vous êtes au top vous le savez déjà ! Je vous aime très fort <3 Ca aussi vous le savez déjà, mais ca fait pas de mal de le répéter de temps en temps ;)

Je te fais de gros bisous Aurélie. Notre amitié remonte presque au jardin d'enfant, et chaque fois qu'on se retrouve, c'est comme si on s'était vu hier ! Et puis un gros bisou à Lolo aussi :*

Gloria et Tonio, Céline et Filipe, je pense très fort à vous. J'ai grandi à vos côtés, vous avez veillé sur moi. Et aujourd'hui, c'est vos petits (plus si petits maintenant !) que je vois grandir. Gros bisous Erika, Jess, Tati et Dono. C'est toujours un bonheur de vous retrouver.

Un grand merci à toute ma famille que j'aime de tout mon cœur. Ça fait maintenant trois ans que vous me demandez quand est-ce que je finis, on y est, c'est maintenant ! Désolée les Tatas, avec la situation actuelle, on ne pourra pas partager de mini quiche ou de bons gâteaux autour d'un beau pot de thèse. C'est pas grave, j'attendrai Noël ! ;) Tonton Jean-Jacques, Tata Françoise, Julien, Melkiki, France, Serge, Zach, Nono, Salomé, Tata Danielle M, et Tata Danielle J, Hélène et les garçons, Jojo et Lucas, Laurent et toute la petite famille, Virginie, Nina, Zoé, j'espère vous voir très vite. Je pense très fort à vous <3

Mes petites sœurs d'amour, Rom et Raph, on partage nos vies depuis maintenant 26 et 24 ans. On peut dire que vous avez parfois été relous, vous êtes les seules personnes qui peuvent me faire sortir de mes gonds ! Et pourtant, je ne vous échangerais pour rien au monde, vous êtes les meilleures sœurs de la Terre. J'adore la relation qu'on a, si différentes et si complémentaires en même temps. Je sais que je peux venir vous trouver à n'importe quelle heure. Je vous le dis jamais, mais en vrai je vous aime très fort <3 Je suis à deux doigts de verser une petite larme ^^ Un gros bisou à Adrien aussi, qui prend soin de ma sœur et qui fait maintenant parti de notre famille :)

Mon petit Papa, ma petite Maman, vous vous doutiez il y a presque 29 ans que vous enfantiez un Docteur ? C'est un petit peu grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Je me doute que je n'ai pas toujours été facile (même si objectivement, je ne vois pas à quel moment ça a été le cas), mais merci d'être là pour me guider et m'aider dans la vie. Vous êtes les meilleurs ! J'espère aujourd'hui vous rendre fière, au moins autant que je suis fière d'être votre première pépite ! Je vous aime.

Et pour finir, je remercie du fond du cœur Guillaume, qui est là depuis presque 4 ans, à me supporter tous les jours ! Et autant ma famille, ils sont obligés, autant toi, tu l'as choisi ! Tu as toujours été d'un soutien infaillible. J'espère réussir à te rendre tout ce que tu m'apportes. Merci d'avoir mis des paillettes dans ma vie !

PS : je voudrais aussi avoir une petite pensée pour KeenV, dont les chansons m'ont fait danser, et ont mis du soleil dans mes petits moments de doute.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
I. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	19
A. Généralités	19
B. Origine et classification	20
C. Génome et protéines virales	22
D. Structure de la particule virale.....	24
E. Cycle de réplication du virus.....	26
1. Etapes précoces.....	27
a. Entrée.....	27
b. Transport et transcription inverse	28
c. Décapsidation.....	30
<i>Modèles de décapsidation.....</i>	<i>30</i>
<i>Lien entre décapsidation et transcription inverse</i>	<i>32</i>
<i>Rôle de la cyclophiline A</i>	<i>33</i>
d. Import nucléaire	34
e. Intégration au génome cellulaire	34
2. Etapes tardives	35
a. Transcription et traduction des protéines virales	36
b. Assemblage et maturation des particules virales.....	37
II. Immunité et facteurs de restriction	38
A. Le système immunitaire.....	39
1. Généralités sur le système immunitaire.....	39
2. La réponse immunitaire innée	40
3. La réponse immunitaire déclenchée par le VIH	41
a. Détection de l'ADN double brin viral.....	43
b. Détection de l'ARN viral	43
c. Détection d'autres composés viraux.....	44
d. Stratégies d'échappement mises en place par le virus	44
B. Protéines antivirales : les facteurs de restriction et de résistance	45
1. Les facteurs antiviraux ciblant le VIH	45
2. Les facteurs de restriction ciblant la transcription inverse	47
a. APOBEC3G.....	47
b. SAMHD1.....	48
c. TRIM5 α	49
III. Le processus de SUMOylation	51

A. Découverte	51
B. Les protéines SUMO	52
C. Le mécanisme de SUMOylation	53
1. Cascade enzymatique de SUMOylation	54
2. Motif consensus de SUMOylation	56
D. Autre type de liaison dépendante de SUMO	56
E. Rôle de la SUMOylation	57
F. Les corps nucléaires PML	58
IV. La protéine Daxx	61
A. Fonction	61
1. Apoptose	62
2. Répression transcriptionnelle	63
3. Facteur de résistance	65
B. Localisation	66
1. Cytoplasme	66
2. La chromatine	66
3. Les corps nucléaires PML	67
C. Structure	67
1. Daxx helical bundle	68
2. Le domaine d'interactions aux histones	69
3. Les motifs d'interaction avec SUMO	69
4. Les modifications post-traductionnelles de Daxx	70
5. Les différentes isoformes de Daxx	70
OBJECTIFS	71
MATERIEL & METHODES	75
Plasmides	77
Culture cellulaire	77
Production et titration des vecteurs VIH-1 pseudotypés VSV-G et HA-Daxx	77
Transfection	78
Transduction des cellules	78
Cytométrie en flux	79
Fractionnement subcellulaire	79
Immunoprécipitations	80
Western-Blot	80
Quantification des rétro-transcrits par PCR quantitative	81
Spectrométrie de masse <i>label free</i>	82
SILAC	82

Etude du devenir de la capsid : <i>Fate of capsid assay</i>	84
Immunofluorescence.....	85
RESULTATS	87
I. Inhibition SUMO-dépendante de la transcription inverse et de la décapsidation du VIH-1 par Daxx	89
II. Identification des partenaires de Daxx par spectrométrie de masse	111
A. Spectrométrie de masse <i>label free</i>	111
1. Optimisation de la transfection.....	112
2. Optimisation de la transduction.....	113
3. Optimisation de l'immunoprécipitation.....	114
4. Résultats de la spectrométrie de masse <i>label free</i>	116
B. SILAC.....	120
1. Test d'incorporation des isotopes	120
2. Optimisation de l'expérience SILAC.....	121
III. Etude des partenaires viraux de Daxx	122
IV. Autres observations	123
A. Productions de lentivecteurs HA-Daxx.....	123
B. Incorporation de Daxx dans les particules virales.....	125
DISCUSSION	127
Rôle de la SUMOylation dans l'activité antivirale de Daxx.....	130
Identification de partenaires cellulaires de Daxx par spectrométrie de masse.....	131
Validation des candidats identifiés par spectrométrie de masse	132
Les partenaires viraux	135
Stabilisation de la capsid du VIH-1 par Daxx	135
Inhibition d'autres rétrovirus : un autre mécanisme ?	137
Incorporation de Daxx dans les particules virales.....	137
CONCLUSION	141
REFERENCES	145
ANNEXES	181
Annexe 1.....	183
Annexe 2 :	185

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Origine des virus de l'immunodéficience humaine	21
Figure 2 : Structure du génome viral	22
Figure 3 : Structure d'une particule virale mûre du VIH-1	25
Figure 4 : Structure de la capsid du VIH	25
Figure 5 : Schéma des étapes précoces du cycle de réplication du VIH.....	27
Figure 6 : Schéma détaillé de la transcription inverse du génome du VIH	29
Figure 7 : Différents modèles de décapsidation.....	31
Figure 8 : Schéma des étapes tardives du cycle de réplication du VIH	36
Figure 9 : Maturation des particules virales.....	38
Figure 10 : Composants cellulaires du système immunitaire.....	39
Figure 11 : Réponse immunitaire innée déclenchée par le VIH-1.....	42
Figure 12 : Les facteurs antiviraux ciblant différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1	46
Figure 13 : Schémas de l'interaction entre TRIM5 α et la capsid du VIH	50
Figure 14 : Structure tridimensionnelle de SUMO	52
Figure 15 : Cascade enzymatique de SUMOylation	54
Figure 16 : Formation de chaînes polySUMO.....	56
Figure 17 : Conséquences de la SUMOylation	57
Figure 18 : Formation des corps nucléaires PML	60
Figure 19 : Principales localisations subcellulaires et fonctions de Daxx.....	62
Figure 20 : Répression transcriptionnelle exercée par Daxx.....	63
Figure 21 : Structure de la protéine Daxx et association avec ses différents partenaires	68
Figure 22 : Mises au point des conditions de transfection du plasmide HA-Daxx	112
Figure 23 : Mises au point des conditions de transduction du vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G	114
Figure 24 : Mises au point des conditions d'immunoprécipitation.....	115
Figure 25 : Expérience de spectrométrie de masse label free	116
Figure 26 : Résultats de la spectrométrie de masse label free	117
Figure 27 : Principe du SILAC.....	120
Figure 28 : Résultats du SILAC	121
Figure 29 : Daxx interagit avec la protéine virale p6.....	122
Figure 30 : Production de lentivecteurs exprimant Daxx.....	124
Figure 31 : Incorporation de Daxx dans les particules virales	125
Figure 32 : Schéma du complexe multiprotéique formé par Daxx	130

Figure 33 : Etude in silico des potentiels sites de SUMOylation de la cyclphiline A 132

LISTE DES ABREVIATIONS

APOBEC3G : *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide like 3G*

ASP : protéine antisens (*Anti-Sens Protein*)

ATRX : *α-thalassemia/mental retardation, X-linked syndrome*

Bst-2 : *Bone marrow stromal antigen 2*

CA : protéine de capsid p24

cGAMP : *cyclic GMP–AMP*

cGAS : *cGAMP synthase*

CN PML : corps nucléaire PML

CypA : cyclophiline A

Daxx : *Death domain-associated protein 6*

DC : cellule dendritique (*dendritic cell*)

DNMT : *DNA-méthyl transferase*

ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HA : hémagglutinine

HDAC : histone déacétylase

HEK : cellules humaines embryonnaires de rein (*human embryonic kidney cells*)

HUSH : *human silencing hub*

IFITM: *Interferon-induced transmembrane protein*

IFN: interféron

IN: Intégrase

IRF : *Interferon Regulatory Factor*

ISG : gene stimuli par l'interféron (*Interferon-Stimulated Gene*)

LT-CD4 : Lymphocyte T CD4 +

LTR : *long terminal repeat*

MA : matrice

MDA5 : *melanoma differentiation-associated protein 5*

MLV : virus de la leucémie murine (*Murine Leukemia Virus*)

MX2 : *myxovirus resistance 2*

NC : nucléocapside

Nef : *negative regulatory factor*

NF-κB : *nuclear factor-kappa B*

NLS : signal de localisation nucléaire (*nuclear localization signal*)

Nup153 : nucléoporine 153

NVP : névirapine

PAMPS: *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS : *primer binding site*

PIC : complexe de pré-intégration (*pre-integration complex*)

PML : *promyelocytic leukemia protein*

PR : protéase

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

RanBP2 = Nup358 : *RAN binding protein 2*

RBCC : RING – B-box – coiled coil

Rev : *Regulator of Virion*

RIG-I : *retinoic acid inducible gene 1*

RING : *Really Interesting New Gene*

RT : transcriptase inverse (*reverse transcriptase*)

RTC : complexe de transcription inverse
(*reverse transcription complex*)

STING : *Stimulator of interferon genes*

SAE : *SUMO activating enzyme*

SAMHD1 : *sterile α motif and histidineaspartic acid domain-containing protein 1*

SENP : *Sentrin specific protease*

SERINC: *Serine Incorporator*

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SILAC : *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*

SIM : motif d'interaction à SUMO (*SUMO-Interacting motif*)

SLFN11: *Schlafen family member 11*

SUMO : *Small Ubiquitin like modifier*

Tat : *transactivator of transcription*

TLR : *Toll-like receptor*

TNPO : *transportine*

TRIM : *Tri-partite motif protein*

Vif : *Viral infectivity factor*

VIH : Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine

VIS : virus de l'immunoDéficiency simienne

Vpr : protéine virale R (*viral protein R*)

Vpu : protéine virale U (*viral protein U*)

Vpx : protéine virale X (*viral protein X*)

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

WT : sauvage (*wild type*)

ZAP : *Zinc-finger antiviral protein*

INTRODUCTION

I. Le virus de l'immunodéficience humaine

A. Généralités

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1, ou VIH-1, est l'agent responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise, ou SIDA. Il est à l'origine d'une pandémie mondiale touchant près de 38 millions de personnes à travers le monde en 2018 (Rapport ONUSIDA 2019). La phase de SIDA déclaré est le dernier stade de l'infection provoquée par le VIH. En absence de traitement, elle se caractérise par une diminution progressive du taux de lymphocytes T CD4+ (LT-CD4), principales cibles du virus, en réponse à l'activation chronique du système immunitaire. Cette réduction graduelle peut s'étaler sur plusieurs années, et passé le seuil de 200 LT-CD4 par mm³ de sang, le système immunitaire affaiblit favorise l'émergence de maladies opportunistes causant la mort des patients infectés. S'il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin permettant de lutter contre ce virus, de nombreux traitements antirétroviraux sont disponibles, et environ 60% des malades ont accès à ces thérapies. Sans que l'épidémie ne soit maîtrisée pour le moment, ces traitements ont largement participé à la diminution du nombre de contaminations.

Les premières descriptions du SIDA remontent au début des années 80 aux États-Unis : un rapport du CDC (Center for Disease Control and Prevention) fait état de l'émergence de maladies opportunistes habituellement caractéristiques d'un état d'immunodépression avancé au sein de la communauté homosexuelle (Gottlieb et al. 1981). Le virus prend rapidement de l'ampleur et se propage dans le monde entier, aboutissant à une pandémie. En 1983, une équipe française de l'institut Pasteur parvient à isoler le virus responsable de ces maladies, le VIH (Barré-Sinoussi et al. 1983). Pour cette découverte majeure, le prix Nobel de physiologie et médecine sera décerné à Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier en 2008 pour leurs travaux sur le sujet. En 1986, le VIH-2, un second type de virus, a été découvert par François Clavel (Clavel et al. 1986). Contrairement au VIH-1 qui a colonisé l'ensemble de la planète, le foyer épidémique du VIH-2 est restreint à l'Afrique de l'Ouest. Certaines études montrent que ce virus se transmet moins efficacement que le VIH-1, en partie à cause d'une charge plasmatique plus faible mesurée chez les patients atteints du VIH-2 (Visseaux et al. 2016).

Le VIH-1 se transmet suivant trois modes de contaminations : les voies sexuelles, sanguines ou maternelles. Les rapports sexuels non protégés sont à l'origine de la grande majorité des contaminations. La transmission par voie sanguine est essentiellement observée au sein de populations toxicomanes lors d'échange de matériel souillé, ou bien dans le cadre hospitalier avec la projection de sang contaminé. Enfin, la transmission de la mère à l'enfant peut intervenir pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement.

Comme tous les virus, le VIH doit infecter une cellule cible pour se multiplier et se propager. La présence de récepteur et corécepteurs particuliers à la surface des cellules détermine le tropisme du VIH, c'est-à-dire l'ensemble des cellules qui peuvent être infectées. L'enveloppe du VIH reconnaissant spécifiquement le récepteur CD4 (Maddon et al. 1986) et le corécepteur CXCR4 (Feng et al. 1996) ou CCR5 (Dragic et al. 1996), ces derniers doivent être exprimés en surface des cellules cibles pour que le virus puisse entrer et se multiplier. Le récepteur CD4 se retrouve principalement sur la membrane des lymphocytes T CD4+, et dans une moindre mesure, à la surface des macrophages et des cellules dendritiques immatures. CXCR4 est exprimés par les LT-CD4 naïfs, tandis que les LT-CD4 mémoires et les macrophages portent le corécepteur CCR5. Selon leur tropisme, les virus peuvent être catégorisés en trois groupes : les virus R5 T tropiques, R5 M tropiques, ou X4 T tropiques. Les virus R5 T tropiques, qui infectent surtout les LT-CD4 mémoires, sont particulièrement importants pour la propagation du virus dans la population puisque ce sont les seuls à être transmis d'un individu à l'autre (Keele et al. 2008; Ping et al. 2013).

B. Origine et classification

Le VIH provient de plusieurs franchissements de la barrière inter-espèce qui existe entre les primates et l'Homme. En effet, plus de 40 espèces de primates sont naturellement porteuses de différents types de virus de l'immunodéficience simienne, ou VIS, qui ne sont pas tous pathogènes pour leur hôte. Il semblerait que ces VIS aient réussi à infecter l'homme à l'occasion de morsures de singe ou de coupures pendant la préparation de la viande de brousse dans des zones géographiques où l'homme et les primates se côtoient, comme c'est le cas en Afrique. Même si la majorité des transmissions de virus entre espèces différentes reste occasionnelle et limitée à l'échelle de l'individu, certains VIS ont traversé la barrière inter-espèce pour infecter l'homme et généré un nouveau virus, le VIH (Sharp et Hahn 2011) (Figure 1).

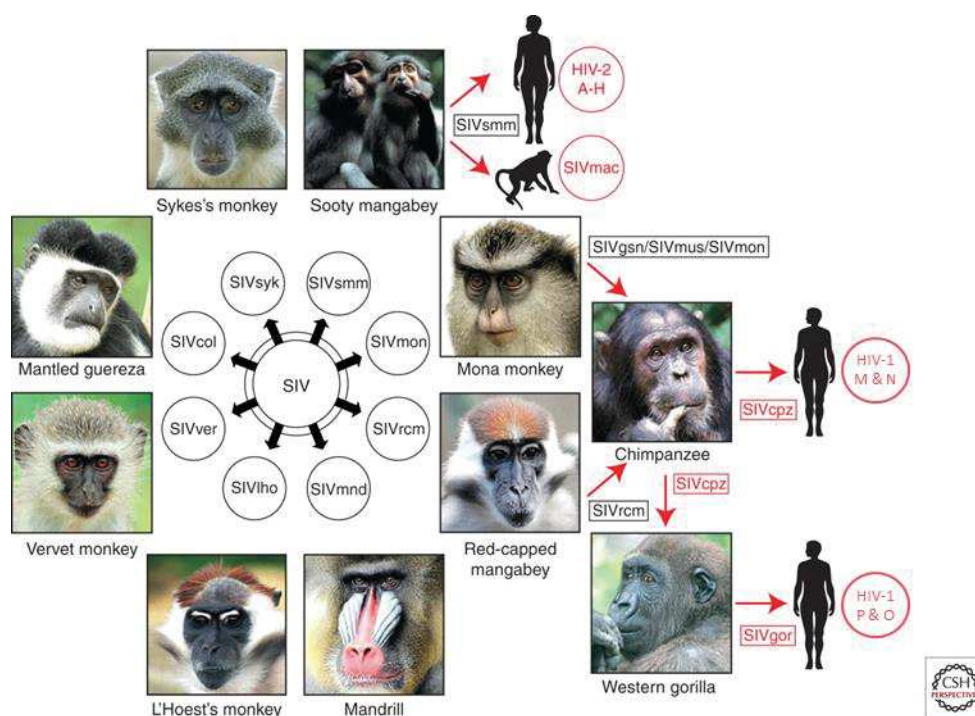


Figure 1 : Origine des virus de l'immunodéficience humaine

Plus de 40 espèces de primates sont infectées par différents lentivirus appelés Virus de l'immunodéficience simienne (VIS), auxquels s'ajoute un suffixe à 3 lettres désignant l'espèce d'origine du virus. Le franchissement de la barrière inter-espèces existant entre l'homme et les singes a provoqué l'émergence de nouveaux virus, dont les VIH. D'après (Sharp et Hahn 2011)

Il existe quatre groupes de VIH-1, chacun issu d'un franchissement de barrière indépendant, et classés en fonction de leur origine. Le groupe M (« Major »), responsable de la pandémie actuelle, et le groupe N (non M et non O) proviennent de la transmission du SIV du chimpanzé (SIVcpz) à l'Homme dans deux zones géographiquement distinctes d'Afrique (Figure 1). Le SIV de gorille (SIVgor) est quant à lui à l'origine des groupes O (« outlier ») et P. Ce dernier groupe n'a été retrouvé que chez deux malades à ce jour (D'arc et al. 2015). D'après une analyse phylogénétique, il semblerait que les groupes M et O soient apparus dans les années 1920, à proximité de Kinshasa, capitale de l'actuelle République Démocratique du Congo (Faria et al. 2014).

En ce qui concerne le VIH-2, il en existait en 2011 huit groupes (A à H), issus de l'infection du singe sooty mangabey par huit SIV différents (Sharp et Hahn 2011) (Figure 1). Toutefois, une équipe a rapporté l'existence d'un neuvième groupe I, en 2013 (Ayouba et al. 2013). A l'heure actuelles, les pratiques de chasse et la consommation de viande de singe expose toujours les populations aux VIS circulant chez les primates, et pourraient être à l'origine de nouveaux franchissements de barrière inter-espèce, comme cela a été montré dans le cas de l'émergence du dernier type de VIH-2 (Ayouba et al. 2013). En effet, une seule transmission de VIS est à l'origine de la pandémie mondiale actuelle (VIH group M) (Peeters, Jung, et Ayouba 2013).

le glissement du ribosome qui induit un décalage du cadre de lecture, l'épissage alternatif, ou encore la transcription antisens à partir du LTR 3'.

Les gènes *gag*, *pol* et *env* sont transcrits et traduits sous forme de précurseurs du même nom qui seront clivés dans un second temps par des protéases virales ou cellulaires. Les protéines de structure matrice MA/p17, capsid CA/p24 et nucléocapside NC/p7, ainsi que la protéine p6 sont codées par le gène *gag* et générées suite au clivage par la protéase virale durant la maturation (Figure 2). La polyprotéine Gag joue un rôle déterminant au cours de l'assemblage et du bourgeonnement des nouveaux virions. Le précurseur Gag-Pol résulte d'un saut du ribosome ayant pour conséquence un décalage du cadre de lecture. Cette polyprotéine est à l'origine des trois enzymes virales essentielles à la réplication du virus (Figure 2). La protéase PR intervient au cours de la maturation, la transcriptase inverse RT permet la conversion de l'ARN viral monocaténaire en un ADN double brin, et l'intégrase IN est à l'origine de l'intégration de cet ADN viral au génome de la cellule. Le gène *env* est transcrit puis traduit sous la forme de la polyprotéine gp160. Une fois glycosylée dans le réticulum endoplasmique/Golgi, elle est clivée par une protéase cellulaire, la furine (Hallenberger et al. 1992), pour produire les deux glycoprotéines constitutives de l'enveloppe gp120/SU et gp41/TM. Ensemble, elles forment un hétérodimère impliqué dans la reconnaissance du récepteur CD4 et du corécepteur CXCR4 ou CCR5. La grande variabilité de la gp120 est en partie responsable de l'échappement du virus au système immunitaire (Munro et Mothes 2015).

Les protéines Vif, Vpu et Vpr sont produites à partir d'ARN messagers (ARNm) partiellement épissés (Figure 2). Une fois synthétisée, la protéine Vif (*Virion Infectivity Factor*) est incorporée dans les particules virales, et son rôle est de contrecarrer l'effet du facteur de restriction APOBEC3G (*APOlipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide like 3G*) (Sheehy et al. 2002) en induisant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale (Yu et al. 2003). Vpu (*Viral Protein Unique*) cible quant à elle le facteur de restriction Bst2 (*bone marrow stromal antigen 2*, ou Téthérine) (Neil, Zang, et Bieniasz 2008). Dans le cas du VIH-2, on ne trouve pas Vpu mais une autre protéine auxiliaire, Vpx, chargée de s'opposer au facteur de restriction SAMHD1 (*sterile α motif and histidineaspartic acid domain-containing protein 1*) (Laguette et al. 2011). En ce qui concerne la protéine Vpr (*Viral Protein R*), des travaux ont montré que celle-ci pouvait bloquer le cycle cellulaire en phase G2 (Jowett et al. 1995) en provoquant la dégradation de la protéine CCDC137 (Zhang et Bieniasz 2020), et qu'elle interférait avec les machineries de réparation de l'ADN pour favoriser la réplication du virus, en induisant par exemple la dégradation de la protéine HTLF (Lahouassa et al. 2016).

Enfin, les ARNm doublement épissés seront à l'origine des protéines Rev, Tat et Nef (Figure 2). Rev, en collaboration avec d'autres partenaires cellulaires, permet l'export des ARN viraux partiellement ou non épissés vers le cytoplasme. Tat est un facteur qui induit la transcription efficace du provirus intégré. Enfin, la protéine Nef (*NEgative Factor*) facilite la libération des particules virales néo-formées : en diminuant l'expression du CD4 à la surface des cellules infectées (Garcia et Miller 1991), Nef favorise l'incorporation de la gp120 dans les particules virales libérées lors du bourgeonnement (Lama, Mangasarian, et Trono 1999). De plus, l'expression de surface du complexe majeur d'histocompatibilité CMH-I est également diminuée par Nef (Schwartz et al. 1996), ce qui évite à la cellule infectée d'être neutralisée par d'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Collins et al. 1998). Enfin, à l'instar d'autres protéines accessoires qui interfèrent avec différents facteurs de restriction, Nef peut aussi contrecarrer l'effet de SERINC3/SERINC5, qui bloquent normalement la fusion des membranes virales et cellulaires (Usami, Wu, et Göttlinger 2015). Nef induit l'endocytose de SERINC3/5, diminuant ainsi leur expression en surface de la cellule productrice.

Un dernier gène, *asp*, situé sur le brin complémentaire à *env*, est transcrit en antisens à partir du LTR 3' et code la protéine antisens Asp (Antisens protein). Son existence a été évoquée pour la première fois en 1988 (Miller 1988), mais reste controversée au sein de la communauté scientifique. Certains groupes ont détecté des transcrits antisens dans des cellules infectées, ou la présence d'anticorps anti-Asp dans le sérum de patients inclus dans deux études cliniques (Mancarella et al. 2019; Savoret et al. 2020; Vanhée-Brossollet et al. 1995).

D. Structure de la particule virale

La particule virale libérée suite au bourgeonnement est une particule dite immature, qui doit subir une dernière étape de maturation caractérisée par un réarrangement structural de la protéine Gag, suite à son clivage par la protéase virale (Figure 3).

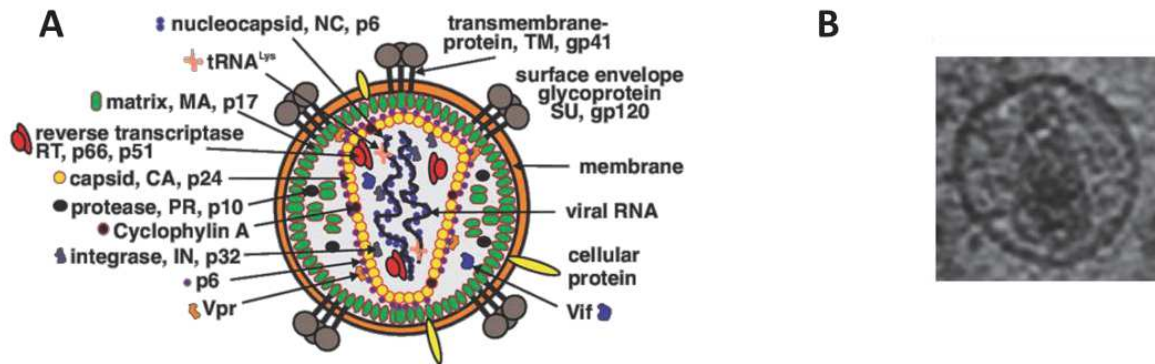


Figure 3 : Structure d'une particule virale mûre du VIH-1

A. Schéma de la structure d'une particule virale mûre, constituée de protéines virales d'une part, et cellulaires d'autre part. (Kirchhoff 2018) **B.** Reconstruction tomographique d'une particule virale mûre. D'après (Briggs et Kräusslich 2011)

Les particules mûres sont de forme sphérique et ont un diamètre compris entre 100 et 200 nm. Le VIH est un virus enveloppé dont l'enveloppe est composée d'une bicouche lipidique issue de la cellule productrice, et dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines virales gp120 et gp41, associées sous forme de trimères. La face interne de l'enveloppe est tapissée par la protéine de matrice. A l'intérieur de la particule, on retrouve la protéase virale, ainsi que les monomères de CA associés pour former une capside conique, ou core, renfermant le génome viral recouvert de nucléocapside, et plusieurs exemplaires des enzymes virales nécessaires à la réplication du virus, IN et RT. La capside peut également contenir des protéines cellulaires comme la cyclophiline A (CypA) (Franke, Yuan, et Luban 1994).

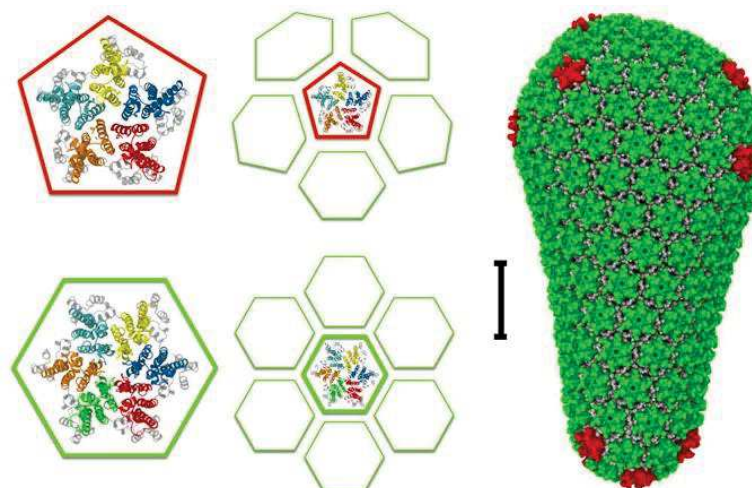


Figure 4 : Structure de la capside du VIH

Les monomères de capside (CA, p24) s'oligomérisent en hexamères (vert) et pentamères (rouge), pour former une cage de capside conique, renfermant entre autres le génome viral et les protéines virales associées. Les NTD des hexamères et pentamères sont colorés, tandis que les CTD sont laissés gris. Echelle : 20 nm. D'après (Grime et al. 2016)

Un monomère de CA est composé de deux domaines structuraux, le NTD et le CTD (Domaine N- et C-terminal, respectivement), reliés entre eux par une région courte et flexible appelée linker (Figure 4). Environ 1 300 monomères composent la capsid et s'associent en hexamères majoritairement, mais ils peuvent également se retrouver sous forme de pentamères à chaque extrémité de la capsid (Figure 4) : un core est composé d'environ 200 hexamères et 12 pentamères (Mattei et al. 2016).

E. Cycle de réplication du virus

Le cycle de réplication viral décrit les étapes qui permettent au virus de se multiplier au sein d'une cellule, depuis son entrée et jusqu'à la libération de nouvelles particules virales. Il peut être dissocié en deux grandes phases : les étapes précoces, qui correspondent aux événements compris entre l'entrée du virus dans la cellule-hôte et l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire (Figure 5), et les étapes tardives, qui regroupent l'ensemble des étapes de la transcription des gènes viraux jusqu'à la libération et la maturation de nouveaux virions (Figure 8).

1. Etapes précoces

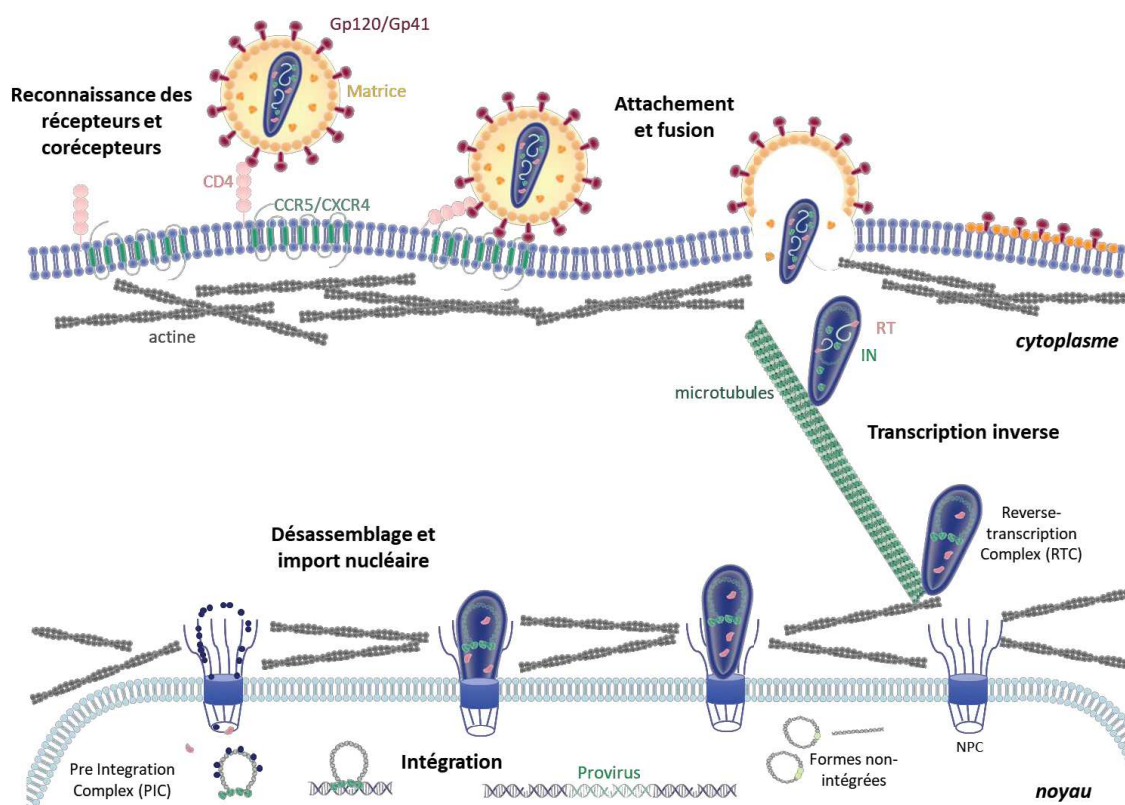


Figure 5 : Schéma des étapes précoces du cycle de réplication du VIH

La reconnaissance des protéines d'enveloppes par les récepteurs et corécepteurs situés à la surface de la cellule cible déclenche la fusion des membranes virales et cellulaires, aboutissant à la libération de la capside dans le cytoplasme. Elle est ensuite prise en charge par le cytosquelette pour être transportée jusqu'à l'enveloppe nucléaire. Au cours de ce transport, le génome viral sous forme d'ARN simple brin est rétro-transcrit en un ADN double brin. Une fois amarrée au pore nucléaire (NPC), la capside se désassemble pour permettre au génome viral d'entrer dans le noyau puis de s'intégrer à la chromatine cellulaire. Schéma fait par Juliette Fernandez.
RT : Rétrotranscriptase. IN : intégrase

a. Entrée

Au cours de la phase d'attachement, les membranes virales et cellulaires se rapprochent pour favoriser le contact entre les protéines d'enveloppe du virus et les récepteurs et corécepteurs cellulaires. Tout commence par la reconnaissance du récepteur d'entrée CD4, exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ principalement, par la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (Maddon et al. 1986; McDougal et al. 1986). Cette reconnaissance induit un changement conformationnel de la gp120, qui lui permet de reconnaître et d'interagir avec le corécepteur CXCR4 ou CCR5. Dans cette configuration, la deuxième protéine d'enveloppe du virus, gp41, déclenche la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, ce qui aboutit à la libération de la capside dans le cytoplasme de la cellule (Wilén, Tilton, et Doms 2012).

b. Transport et transcription inverse

Pour atteindre le noyau, le core est transporté grâce au cytosquelette de la cellule, composé d'un important réseau d'actine et de microtubules (Arhel et al. 2006; McDonald et al. 2002). Dans ce contexte, la cage de capsid joue un rôle capital de par sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines associées au cytosquelette comme les moteurs moléculaires, habituellement utilisés pour le transport de molécules à travers la cellule. Par exemple, les protéines associées aux microtubules MAP1A et MAP1S stabilisent les microtubules pour permettre un transport efficace de la capsid (Fernandez et al. 2015). D'autres protéines telles que BICD2 ou FEZ1, des adaptateurs de dynéine ou kinésine respectivement, sont également impliquées dans le transport intra cellulaire du virus par l'intermédiaire de leur association avec la capsid (Carnes, Zhou, et Aiken 2018; Malikov et al. 2015).

Au cours de ce transport, une étape clé spécifique du cycle de réplication des rétrovirus intervient : la transcription inverse. En effet, si le génome viral est contenu dans la capsid sous forme d'ARN simple brin, il doit être converti en un ADN double brin pour s'intégrer ensuite à la chromatine cellulaire. C'est la fonction de la RT, une enzyme virale associée à l'ARN du virus dans la capsid. Elle est composée de deux sous unités p66 et p51, issues de la polyprotéine Gag-Pol. Elle possède une activité ADN polymérase ARN-dépendante qui lui permet de synthétiser un ADN complémentaire à partir de l'ARN viral, et une seconde activité RNase H, responsable de la dégradation non spécifique de l'ARN au cours de la synthèse d'ADN. La Figure 6 présente en détail chaque étape de la transcription inverse.

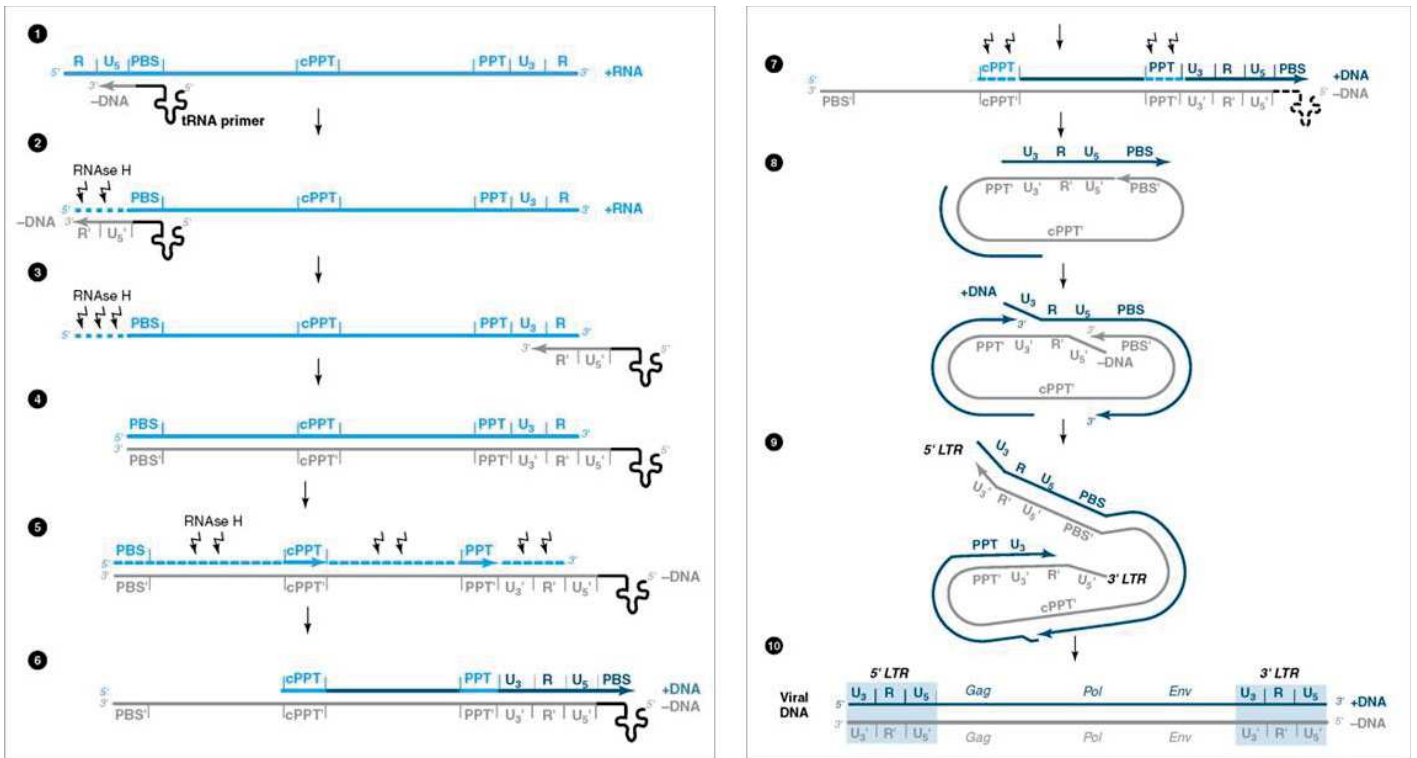


Figure 6 : Schéma détaillé de la transcription inverse du génome du VIH

La transcriptase inverse (RT) initie la synthèse d'un brin d'ADN (-) après reconnaissance de l'ARNtLys, fixé au PBS du brin d'ARN (+) viral (1). La région d'ARN transcrite est dégradée par l'activité RNase de la RT (2). Le fragment d'ADN (-) effectue un premier saut de brin, et s'hybride à l'extrémité 3' de l'ARN (+) viral (3). L'élongation du brin d'ADN (-) se poursuit (4), puis l'ARN génomique (+) est dégradé, à l'exception des régions PPT et cPPT (5), qui servent ensuite d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+) (6). L'ARNtLys et les régions PPT sont à leur tour dégradées (7). Le deuxième saut de brin s'opère : les régions PBS des brins d'ADN (+) et (-) s'hybrident, circularisant ainsi l'ADN en cours de synthèse (8 et 9). La synthèse de l'ADN se poursuit jusqu'à la formation des LTR à chaque extrémité de l'ADN viral double brin (10). D'après (Mak et Saunders 2006)

Dans un premier temps, un ARNt lysine associé à la région PBS (*Primer Binding Site*) de l'ARN viral sert de primer pour la reconnaissance par la RT. Grâce à son activité ADN polymérase, la RT synthétise un morceau d'ADN complémentaire (ADNc) de polarité négative, en direction de l'extrémité 5' de l'ARN viral, formant ainsi un hétéroduplexe ARN/ADN (étape 1). Ce morceau d'ADN est appelé « *ADN strong stop* ». L'activité RNase H prend ensuite le relais pour dégrader l'ARN de l'hybride ARN/ADN (étape 2). Le premier saut de brin intervient, et l'ADNc simple brin s'apparie à la région R du LTR 3' (étape 3). La RT peut alors poursuivre la synthèse de l'ADNc de polarité négative, en direction de l'extrémité 5' de l'ARN viral (étape 4). En parallèle, l'ARN viral est dégradé grâce à l'activité RNase H de la RT, à l'exception de deux zones, cPPT et PPT (PolyPurinesTract), plus résistantes à la RNase H (étape 5). Ces régions particulières servent ensuite d'amorce pour initier la synthèse du brin d'ADN de polarité positive, en direction de l'extrémité 3' du brin d'ADNc (-) (étape 6). Une fois la synthèse initiée, l'ARN viral restant sur les domaines PPT est dégradé, tout comme l'ARNt utilisé pour initier la transcription

inverse (étape 7), ce qui génère deux morceaux d'ADN (+). A cette étape, un deuxième transfert de brin s'opère : le site PBS du brin (+) nouvellement synthétisé, localisé en 3', s'associe au site PBS 5' du brin (-) (étape 8). Chacun des brins poursuit sa synthèse jusqu'au niveau du cPPT, où le brin transféré soulève une petite région appelée ADN Flap (Charneau et al. 1994) (étape 9). A l'issue de la transcription inverse, un ADN viral double brin capable de s'intégrer au génome cellulaire est obtenu (étape 10).

c. Décapsidation

Modèles de décapsidation

La décapsidation est l'étape qui correspond à la déstabilisation et au désassemblage de la capsid, aboutissant à la libération de son contenu dans le cytoplasme de la cellule. La chronologie et la localisation des événements se déroulant à cette étape du cycle de réplication sont encore débattues (Francis et al. 2016; Arhel et al. 2007; Burdick et al. 2020) et plusieurs modèles ont été proposés au fil de l'actualisation des connaissances (Figure 7).

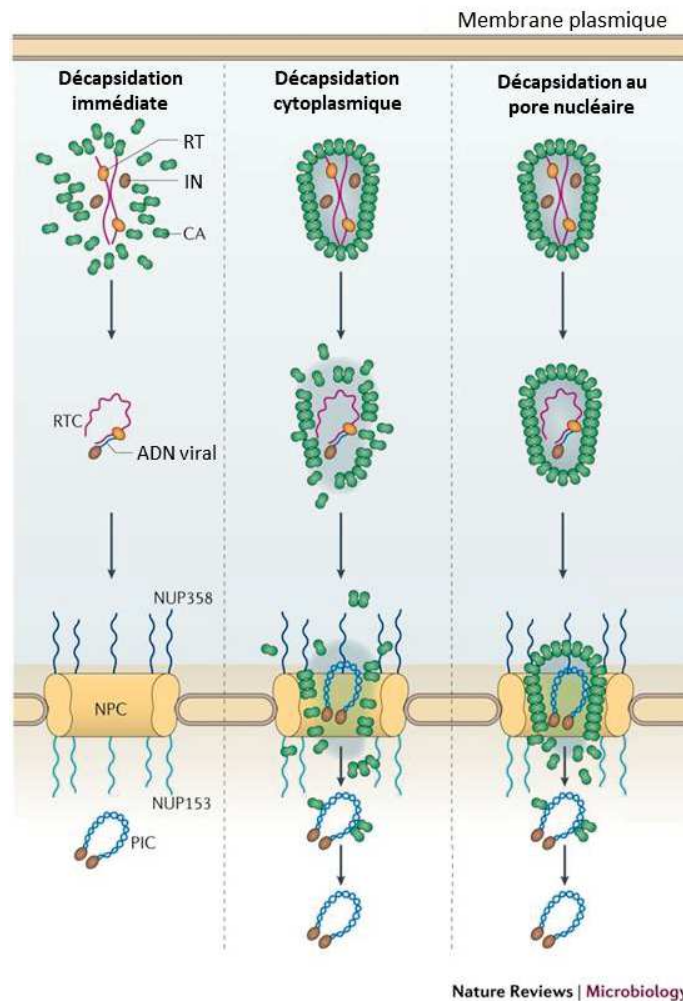


Figure 7 : Différents modèles de décapsidation

Dans le modèle de décapsidation immédiate, la cage de capsid se désassemble dès son entrée dans le cytoplasme, à la suite de la fusion des membranes virales et cellulaires. Dans le modèle de décapsidation cytoplasmique, la décapsidation se fait progressivement, au cours du transport de la capsid jusqu'à l'enveloppe nucléaire. Le modèle de décapsidation au pore est le dernier modèle présenté ici : la décapsidation se produit une fois la capsid amarrée au pore nucléaire. RT : transcriptase inverse. IN : intégrase. CA : capsid. RTC : Complexe de rétro-transcription. NPC : complexe du pore nucléaire. PIC : complexe de pré-intégration. D'après (Campbell et Hope 2015)

Initialement, les scientifiques plaçaient cette étape juste après l'entrée du virus dans la cellule, à la suite de la fusion des membranes virales et cellulaires. L'hypothèse avancée était que la libération du contenu de la capsid permettait une meilleure accessibilité du génome viral aux facteurs nécessaires à la transcription inverse, comme les dNTPs. Dans ce premier modèle, la capsid sert simplement à délivrer le génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée et se dissocie donc rapidement après l'entrée du virus. Les premiers travaux étudiant la composition du RTC ou du PIC montraient une absence de capsid au niveau de ces complexes (Fassati et Goff 2001; Miller, Farnet, et Bushman 1997). Toutefois, ce modèle de décapsidation immédiate implique que le génome viral se retrouve sans

protection dans le cytoplasme de la cellule infectée, des conditions favorables à sa détection par les senseurs cytosoliques de l'immunité (Gao et al. 2013; Lahaye et al. 2013).

Par la suite, il a été montré que certains facteurs impliqués dans l'import nucléaire du VIH-1, comme CPSF6 ou Nup153, reconnaissent un motif uniquement présent au niveau de la capsidie assemblée (Bhattacharya et al. 2014), suggérant ainsi que la capsidie arriverait stable, du moins dans une certaine mesure, au niveau du pore nucléaire. Selon des modèles de décapsidation plus récents (Figure 7), la capsidie se désassemble progressivement au cours de la rétro-transcription et du transport jusqu'au pore nucléaire (Francis et al. 2016). Un modèle alternatif propose que le core arrive intact à proximité de l'enveloppe nucléaire et que la décapsidation se produirait au niveau du pore nucléaire (Arhel et al. 2007; Fernandez et al. 2019).

Au cours des dernières années, certaines équipes ont démontré la présence de capsidie dans le noyau de cellules infectées par le VIH-1 (Chin et al. 2015; Hulme et al. 2015). Ces indications sont en faveur d'un dernier modèle selon lequel la décapsidation se produirait dans le noyau, une fois la transcription inverse terminée (Burdick et al. 2020; Dharan et al. 2020). Dans cette configuration, la capsidie joue un rôle majeur au cours de l'ensemble des étapes précoces du cycle de réplication en protégeant le génome viral des senseurs cytoplasmiques et facteurs de restrictions d'une part (Gao et al. 2013; Lahaye et al. 2013), et en recrutant des facteurs cellulaires impliqués dans le transport, la transcription inverse, le désassemblage ou l'import nucléaire d'autre part (Burdick et al. 2020; Novikova et al. 2019).

Lien entre décapsidation et transcription inverse

De plus en plus d'articles montrent que les étapes précoces, et notamment la transcription inverse et la décapsidation, sont des événements étroitement liés l'un à l'autre, qui pourraient se produire de manière concomitante et non séquentielle, même si le déroulement exact de ces événements n'est pas encore clairement établi. Certains travaux montrent que l'inhibition de la transcription inverse retarde la décapsidation (Hulme, Perez, et Hope 2011; Yang, Fricke, et Diaz-Griffero 2013), tandis que d'autres articles suggèrent que la rétro-transcription initie le désassemblage de la capsidie (Zhang et al. 2000; Rankovic et al. 2017). La coordination de ces deux étapes étant essentielle, une dérégulation de cette coordination peut avoir des effets néfastes sur la réplication du virus. C'est par exemple le mécanisme par lequel TRIM5 α (*Tripartite motif protein 5 α*) exerce son activité antivirale : TRIM5 α inhibe la rétro-transcription en induisant un désassemblage précoce de la capsidie (Stremlau et al. 2006). La coordination des étapes précoces est donc essentielle pour que le virus puisse correctement se propager, et de nombreux facteurs cellulaires comme RanBP2 (*RAN binding protein 2*) (Di Nunzio et

al. 2012), TNPO1 (transportine 1) (Fernandez et al. 2019), TNPO3 (transportine 3) (Valle-Casuso et al. 2012) ou Nup153 (Di Nunzio et al. 2013) les régulent en interagissant avec la capsid.

Rôle de la cyclophiline A

La cyclophiline A (CypA) est l'un de ces composants cellulaires interagissant avec la capsid et impliqués dans la régulation de la stabilité de la capsid. La CypA appartient à la famille des peptidyl-prolyl cis trans isomérases. Ces protéines ont une expression ubiquitaire. Elles sont impliquées dans la structuration des protéines en catalysant le changement d'orientation cis/trans de liaisons peptidiques en amont de résidus prolines de ses protéines-cibles. Il existe 17 isoformes de cyclophilines, comportant chacune un domaine commun CLD, responsable de l'activité catalytique. D'autres domaines propres à chaque protéine leur confèrent une fonction ou une localisation particulière. La CypA ne comporte qu'un domaine CLD, et est localisée dans le cytoplasme.

Au début des années 90, une équipe a montré par double hybride que CypA était capable d'interagir avec Gag (Luban et al. 1993). Cette interaction a par la suite été confirmée par différentes méthodes, et c'est grâce à la liaison de CypA à la capsid que cette protéine cellulaire est incorporée dans les particules virales (Franke et al. 1994; Thali et al. 1994), vraisemblablement exposée sur la face externe de la capsid : l'interaction s'établit entre le site actif de la CypA et le NTD de la CA, plus précisément au niveau des résidus G89 et P90 (Braaten, Franke, et Luban 1996; Gitti et al. 1996). Une mutation de l'un de ces deux acides aminés abroge l'interaction entre les deux protéines, et diminue l'infectivité des particules virales (D. Braaten, Franke, et Luban 1996; Gamble et al. 1996).

La CypA joue un rôle important au cours de plusieurs étapes du cycle de réplication viral, même si ce rôle semble varier en fonction de nombreux facteurs comme le type cellulaire (De Iaco et Luban 2014; Li, Kar, et Sodroski 2009) ou la concentration en CypA dans la cellule (Liu et al. 2016). L'influence de la CypA sur les différentes étapes du cycle est étudiée par l'intermédiaire de la dissociation de l'interaction capsid-CypA, que soit au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques comme la cyclosporine A (CsA), ou génétiques avec l'utilisation de mutants de capsid. Dans certains types cellulaires, lorsque la CypA ne peut plus interagir avec la capsid, plusieurs travaux montrent une diminution de l'infectivité du VIH-1 (Braaten et Luban 2001; De Iaco et Luban 2014). D'autres articles montrent que la CypA favorise la transcription inverse (Braaten et al. 1996; De Iaco et Luban 2014). En outre, ce dernier article montre que la diminution d'infectivité observée dans les cellules serait liée à un défaut d'import nucléaire de l'ADNc viral, conférant à la CypA une fonction dans cette étape du cycle de

réplication viral. De nombreux travaux soulignent également le rôle de la CypA dans la stabilité de la capsid, sans déterminer clairement si elle stabilise ou déstabilise la capsid (Li et al. 2009; Liu et al. 2016; Shah et al. 2013). D'autres équipes illustrent l'effet protecteur de la CypA. Une équipe a montré qu'elle protégerait le virus de la détection de son ADNc par les senseurs cytosoliques dans les macrophages (Rasaiyaah et al. 2013). De récents articles ont également montré que la CypA protégerait le virus de l'action de TRIM5 α dans les cellules primaires humaines comme les LT-CD4 et les macrophages, principales cellules cibles du virus (Kim et al. 2019; Selyutina et al. 2020).

d. Import nucléaire

Si d'autres rétrovirus comme le virus de la leucémie murine (MLV) nécessitent la fragmentation de l'enveloppe nucléaire qui s'opère pendant la division cellulaire pour accéder à la chromatine, le VIH est contraint d'utiliser une autre stratégie, puisqu'il est capable d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, comme les macrophages ou les LT CD4 quiescents. Dans la cellule, les échanges nucléocytoplasmiques sont coordonnés par des complexes multiprotéiques répartis sur l'ensemble de la membrane nucléaire, appelés pores nucléaires, et les protéines qui leur sont associées. Une fois transporté à proximité de la membrane nucléaire, la capsid virale s'amarre au pore pour que le complexe de pré-intégration (PIC) soit importé de manière active dans le noyau (Bukrinsky et al. 1992). Le PIC est constitué de l'ADN viral double brin associé à d'autres protéines virales et cellulaires, dont l'IN ou la CA (Bukrinsky et al. 1993). Le mécanisme d'import nucléaire du VIH n'est pas encore totalement élucidé, même si l'on sait que des protéines cellulaires comme RanBP2, Nup153 (Di Nunzio et al. 2012), ou encore TNPO3 (Valle-Casuso et al. 2012) interviennent au cours de cette étape d'import.

e. Intégration au génome cellulaire

L'ADN viral importé s'intègre au génome cellulaire grâce à l'intégrase virale, à proximité des pores nucléaires (Lelek et al. 2015; Marini et al. 2015) au niveau de régions à forte activité transcriptionnelle (Schröder et al. 2002). A la fin de la transcription inverse, un dimère d'IN se lie à chaque extrémité de l'ADN viral, puis les deux dimères s'associent en tétramère. Grâce à son activité 3' processing, l'IN clive le dinucléotide GT de chaque extrémité 3' de l'ADN viral, générant ainsi des extrémités 3' cohésives, avec deux groupements OH libres (Sherman et Fyfe 1990). L'intégrase clive ensuite l'ADN cellulaire pour générer deux extrémités 5'. Par son activité de transfert de brin, ou *strand transfer*, l'enzyme virale lie les extrémités 3' virales et 5' cellulaires par un pont phosphodiester (Engelman, Mizuuchi, et

Craigie 1991). La machinerie cellulaire de réparation de l'ADN est alors mobilisée pour réparer et finaliser l'intégration. Une fois cette étape terminée, l'ADN viral est intégré au génome cellulaire, et on parle alors de provirus.

Si la majorité du génome viral est intégré sous forme de provirus (Avettand-Fènoël et al. 2016), les ADN viraux peuvent également persister dans le noyau sans s'intégrer, sous une forme linéaire ou circulaire à un ou deux LTR (Hamid, Kim, et Shin 2017; Munir et al. 2013).

2. Etapes tardives

Une fois l'ADN viral intégré au génome de l'hôte, les gènes viraux peuvent être transcrits et traduits au cours d'une infection productive, et aboutir à la libération de nouvelles particules virales. Ces différents événements sont présentés dans la Figure 8, qui s'inscrit dans la continuité de la Figure 5 présentant les étapes précoces. Le provirus peut également persister sous forme latente dans la cellule infectée, qui devient alors un réservoir. Dans ce cas, les cellules infectées ne produisent que très peu, voire pas, de protéines virales. Ces réservoirs demeurent des enjeux majeurs dans l'éradication du virus, puisqu'ils peuvent à tout moment être réactivés lors de l'arrêt des traitements, et produire de nouveaux virions (Sadowski et Hashemi 2019).

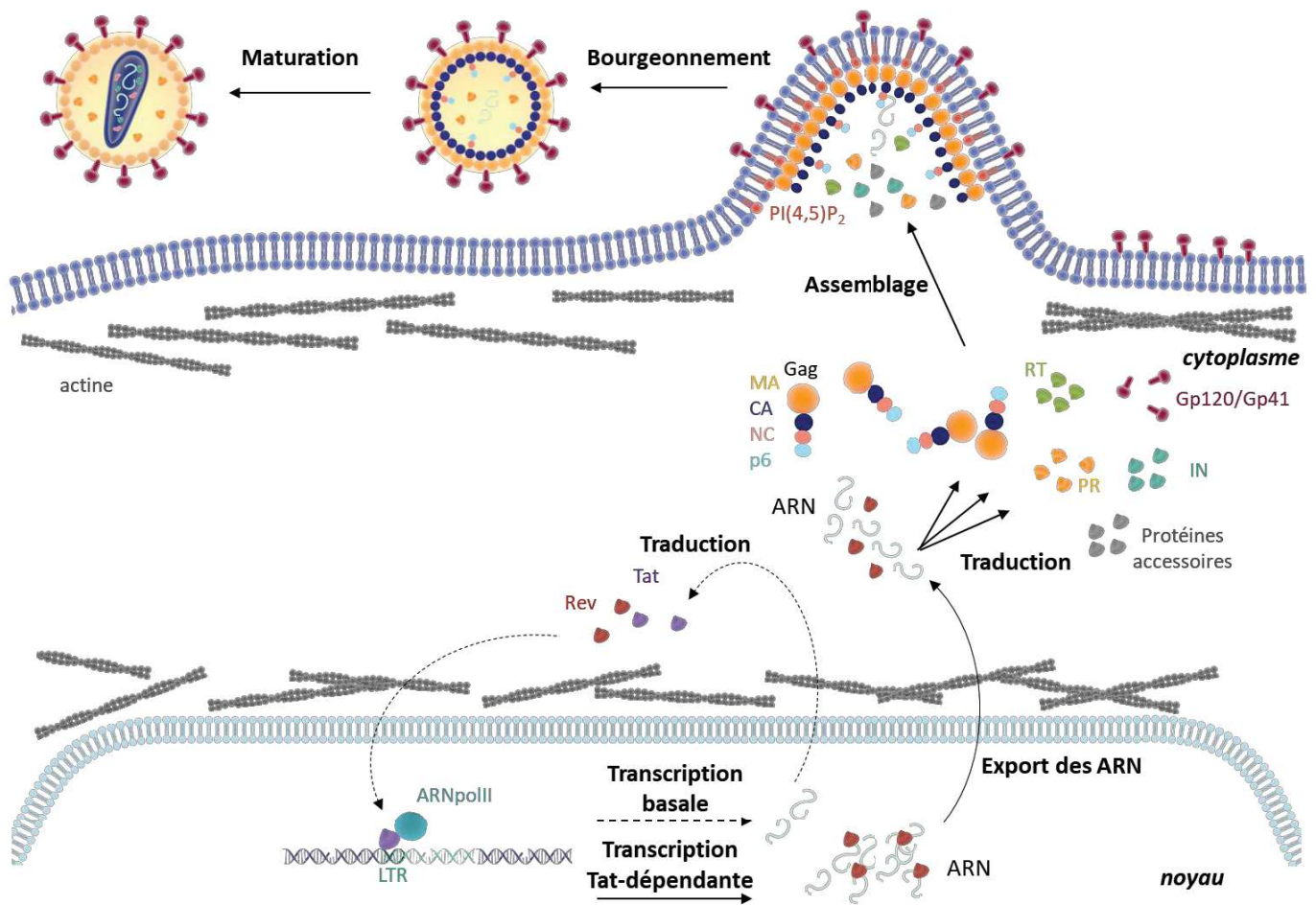


Figure 8 : Schéma des étapes tardives du cycle de réplication du VIH

Une fois le provirus intégré, une première transcription basale impliquant l'ARN polymérase II cellulaire induit la synthèse d'une petite quantité d'ARNm. Suite à leur traduction dans le cytoplasme, les protéines virales Tat et Rev sont réimportées dans le noyau : Tat exacerbe alors la transcription des gènes viraux, tandis que Rev favorise l'export des ARN viraux. Une fois traduites dans le cytoplasme, les protéines virales s'assemblent au niveau de la membrane plasmique, provoquant une courbure de cette dernière, et deux exemplaires d'ARN génomique viral sont encapsidés. Les particules virales immatures produites sont libérées par bourgeonnement. Une dernière étape de maturation, correspondant au clivage de la polyprotéine Gag par la protéase virale, induit un réarrangement drastique des composants viraux, qui aboutit à la formation de particules virales matures et infectieuses. Schéma fait par Juliette Fernandez.

PR : protéase. RT : rétrotranscriptase. IN : intégrase. LTR : Long Terminal Repeat. MA : matrice. CA : capsid. NC : nucléocapside.

a. Transcription et traduction des protéines virales

Une fois le provirus intégré, la transcription des gènes viraux nécessite le détournement de l'ARN polymérase II cellulaire d'une part, recrutée au niveau du LTR qui sert alors de promoteur, et la protéine virale Tat d'autre part (Kao et al. 1987; Sodroski et al. 1985). Une première transcription basale indépendante de Tat induit la synthèse d'une petite quantité d'ARNm. Suite à leur traduction dans le cytoplasme, les protéines Tat et Rev sont réimportées dans le noyau. Tat va alors exacerber la transcription des gènes viraux et produire de grandes quantités d'ARNm susceptibles

d'être épissés par la machinerie d'épissage cellulaire. Rev participe à l'export des ARNm mono- et non-épissés produits (Malim et al. 1989).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le virus a développé diverses stratégies comme la synthèse et le clivage post-traductionnel de précurseurs polyprotéiques, le glissement du ribosome qui induit un décalage du cadre de lecture, l'épissage alternatif, ou encore la transcription antisens à partir du LTR 3' pour exprimer plusieurs protéines à partir d'un nombre limité de gènes. Les ARNm non épissés pourront soit servir d'ARN génomique et être encapsidés dans les nouvelles particules virales, soit servir de matrice pour la traduction des polyprotéines Gag et Gag-Pol (Figure 8). Les ARN épissés peuvent être subdivisés en deux catégories : les ARNm multi-épissés sont traduits pour générer les protéines Tat, Rev et Nef, tandis que les ARNm partiellement épissés sont à l'origine des autres protéines virales, Env, Vif, Vpu et Vpr (Karn et Stoltzfus 2012).

b. Assemblage et maturation des particules virales

Une fois tous les constituants viraux produits, vient l'assemblage (Figure 8). Il s'agit d'un phénomène spontané qui se produit au niveau de la membrane plasmique dans la plupart des cellules infectées, à l'exception des macrophages, dans lesquels l'assemblage se produit dans des compartiments intracellulaires connectés à la membrane plasmique (Nkwe et al. 2016). Au cours de l'assemblage, la polyprotéine Gag joue un rôle pivot, puisque chaque domaine de ce précurseur est impliqué soit dans l'assemblage, soit dans le bourgeonnement des particules virales naissantes. La myristylation N-terminale de la région MA permet l'adressage et l'ancrage du précurseur Gag à la membrane plasmique (Göttlinger, Sodroski, et Haseltine 1989) : la MA lie les phospholipides PI(4,5)P₂, localisés sur la face interne de la membrane (Ono et al. 2004). Le domaine CA est responsable d'interactions protéines-protéines aboutissant à la multimérisation de Gag. Cette accumulation provoque une courbure naturelle de la membrane, qui s'amplifie au cours du temps jusqu'à former un bourgeon puis une sphère. La région NC coordonne quant à elle l'encapsidation du génome viral. Elle reconnaît une structure spécifique en tige boucle localisée dans la partie 5' UTR de l'ARNg viral : le signal d'encapsidation ψ (Guzman et al. 1998). Le reste du génome viral est ensuite lié par de nombreuses protéines NC. Enfin, la région p6, localisée à l'extrémité C terminale de Gag, orchestre le bourgeonnement et la libération des nouvelles particules en détournant la machinerie cellulaire ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) : p6 recrute des partenaires cellulaires comme Tsg101 (Garrus et al. 2001), l'une des protéines composant le complexe ESCRT- I, ou ALIX, qui recrute à son tour le complexe ESCRT-III, et forme des filaments à la base du bourgeon en formation (Strack et

al. 2003). Ces protéines cellulaires permettent à la particule virale nouvellement formée de se détacher de la cellule infectée. Elle emporte au passage une section de la membrane plasmique, qui devient alors un élément constitutif de l'enveloppe virale (Freed 2015).

La particule virale libérée suite au bourgeonnement est dite immature, et n'est pas infectieuse. Une dernière étape est nécessaire pour rendre cette particule infectieuse : la maturation (Figure 9).

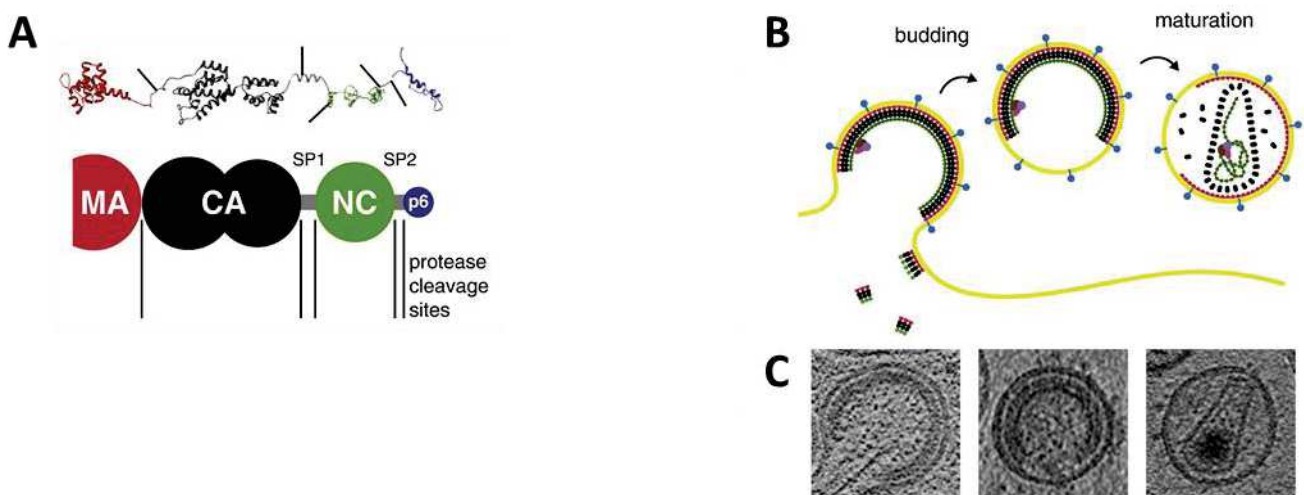


Figure 9 : Maturation des particules virales

A. Structure de la polyprotéine Gag, illustrant les différents domaines la composant, ainsi que les sites de clivages ciblés par la protéase virale au cours de la maturation (traits noirs). **B.** Représentation schématique des différentes étapes du bourgeonnement et de la maturation des particules virales libérées. **C.** Représentation tomographique d'une particule virale en cours de bourgeonnement (gauche), d'une particule immature (milieu), et d'un virion mûre et infectieux (droite).

Rouge : MA (matrice). Noir : CA (capside). Gris : SP1/SP2 (spacer peptides). Vert : NC (nucléocapside). Bleu : glycoprotéines. Jaune : membrane. Violet, marron, rose : protéines accessoires.

D'après (Briggs et Kräusslich 2011)

Cette étape finale est réalisée par la protéase virale (PR), composée de deux sous unités identiques, et son mécanisme d'activation n'est pas clairement identifié. Le clivage séquentiel de la polyprotéine Gag sur différents sites par la PR conduit à la libération de NC, et induit la condensation et la stabilisation du génome viral. Pour terminer, le clivage MA/CA est à l'origine d'un réarrangement drastique au cours duquel les monomères de CA vont s'assembler pour former une capsidie conique renfermant l'ARN génomique viral, associé à la transcriptase inverse et l'intégrase (Figure 9) (Freed 2015).

II. Immunité et facteurs de restriction

A. Le système immunitaire

1. Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire désigne l'ensemble des composants qui permettent à l'organisme de différencier le soi du non-soi, et donc de lutter contre les agents infectieux qui cherchent à pénétrer dans l'organisme. Ce système biologique est composé d'organes spécialisés, comme les ganglions ou les amygdales, de tissus, comme l'épithélium ou les muqueuses, qui constituent une barrière physique à l'entrée des agents pathogènes, de cellules et de molécules anti-infectieuses. On distingue habituellement deux grandes branches au sein de l'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 10).

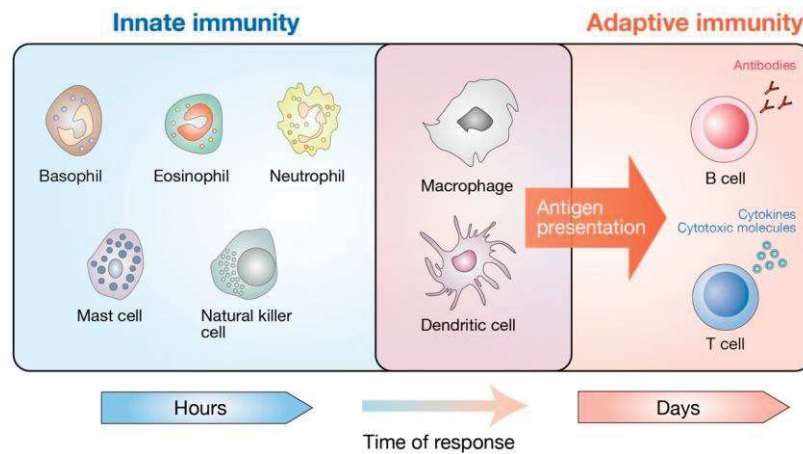


Figure 10 : Composants cellulaires du système immunitaire

Le système immunitaire est composé de deux grandes catégories, l'immunité innée (innate immunity) et l'immunité adaptative (adaptive immunity). Les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les cellules NK (Natural Killer) et les mastocytes (mast cell) modulent la réponse immunitaire innée, qui se met en place rapidement, mais qui n'est pas spécifique de l'agent pathogène détecté. Les cellules présentatrices d'antigènes, macrophages et cellules dendritiques, sont à l'interface entre immunité innée et adaptative, puisqu'elles participent à l'activation des cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes B et T (B cell et T cell respectivement). La réponse adaptative se caractérise par une réponse tardive et spécifique, dirigée contre un antigène précis, et confère une protection durable à l'organisme. (Yamauchi et Moroishi 2019)

L'immunité innée se caractérise par l'induction d'une réponse rapide et non spécifique de l'agent infectieux, deux spécificités fondamentales qui le distinguent du système immunitaire adaptatif, qui induit quant à lui une réponse plus tardive mais hautement spécifique du pathogène détecté par l'organisme. Ces deux systèmes ne sont néanmoins pas indépendants l'un de l'autre, et l'immunité innée joue un rôle pivot dans l'activation de la réponse adaptative, de par sa capacité à induire des effecteurs anti-infectieux comme l'interféron et les cytokines pro-inflammatoires, et par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les cellules dendritiques (Figure 10). Ces cellules font ainsi le lien entre immunité innée et immunité adaptative

Une fois activées, les cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes T et B principalement, vont détruire le pathogène infectant l'organisme par différents mécanismes, comme la sécrétion d'anticorps spécifiques, ou l'activation de LT cytotoxiques. L'une des caractéristiques de la réponse immunitaire adaptative est de constituer une mémoire sur le long terme, qui permettra à l'organisme de se défendre plus efficacement contre un pathogène avec lequel il a déjà été en contact. Plus récemment, une troisième catégorie s'est ajoutée aux deux systèmes connus jusqu'alors, avec la découverte de protéines cellulaires impliquées dans la défense antivirale, les facteurs de restriction. Il s'agit de l'immunité intrinsèque (Bieniasz 2004).

2. La réponse immunitaire innée

L'immunité innée constitue l'une des premières lignes de défense contre les infections, puisque la réponse déclenchée suite à la détection d'un pathogène est rapide, et se met en place en quelques heures. En plus des cellules spécialisées dans la destruction des agents pathogènes, comme les cellules NK (*Natural Killer*) ou les macrophages (Figure 10), les cellules composant les différents tissus de l'organisme détectent ces agents infectieux grâce à des récepteurs appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*), situés dans les membranes cellulaires ou le cytosol. Ces récepteurs reconnaissent des motifs particuliers associés aux agents pathogènes, appelés PAMP (*Pathogen-associated Molecular Patterns*). Ce sont des structures conservées à travers les différents groupes de micro-organismes : par exemple, les composants des parois bactériennes comme les peptidoglycanes ou les lipopolysaccharides sont des PAMP typiques des bactéries, et dans le cas des virus, les glycoprotéines d'enveloppe ou acides nucléiques peuvent être détectés comme des PAMP. C'est par exemple le cas de la protéine d'enveloppe du Cytomegalovirus, qui est détectée par TLR2 (*Toll-like receptor 2*) (Compton et al. 2003). La détection d'un PAMP par un PRR déclenche une cascade de signalisation qui provoque la translocation nucléaire de facteurs de transcription comme IRF3/IRF7 (*interferon regulatory factor*) ou NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), aboutissant alors à l'expression et la sécrétion d'interféron (IFN) et de cytokines pro-inflammatoires, respectivement.

L'IFN a un pouvoir antiviral particulièrement efficace contre un large spectre de virus (Li et al. 2018). Il existe trois types d'IFN, qui exercent leur fonction en se liant chacun à un récepteur spécifique. Les IFN de type I regroupent les interférons α , β , ω , ϵ , et κ , tandis que l'interféron de type II contient uniquement l'IFN γ . Enfin, les IFN de type III regroupent les IFN λ 1 à λ 4. C'est principalement l'IFN-I (plus particulièrement les IFN- α et - β) et l'IFN-III, qui sont impliqués dans la lutte contre les infections virales. Dans un second temps, l'IFN sécrété agit de manière autocrine ou paracrine en se fixant à un récepteur de surface spécifique, et déclenche une nouvelle voie de signalisation, la voie Jak/STAT, qui

aboutit à la transcription de gènes antiviraux regroupés sous le nom de gènes stimulés par l'interféron (ISG, *Interferon-stimulated genes*) (Figure 11). Ainsi, en collaboration avec les cytokines pro-inflammatoires, les produits des ISG établissent un état antiviral dans les cellules situées à proximité de la cellule productrice d'IFN, la protégeant partiellement contre l'agent pathogène détecté dans l'organisme. Par l'intermédiaire de ces produits d'ISG, l'IFN constitue un puissant inhibiteur des infections virales, touchant un large spectre de virus (Schoggins et al. 2011).

3. La réponse immunitaire déclenchée par le VIH

Différents composants du VIH peuvent être détectés par des senseurs cytoplasmiques comme cGas (*cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase*), IFI16 (*γ-interferon inducible protein 16*), RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) ou encore TLR7 (Figure 11).

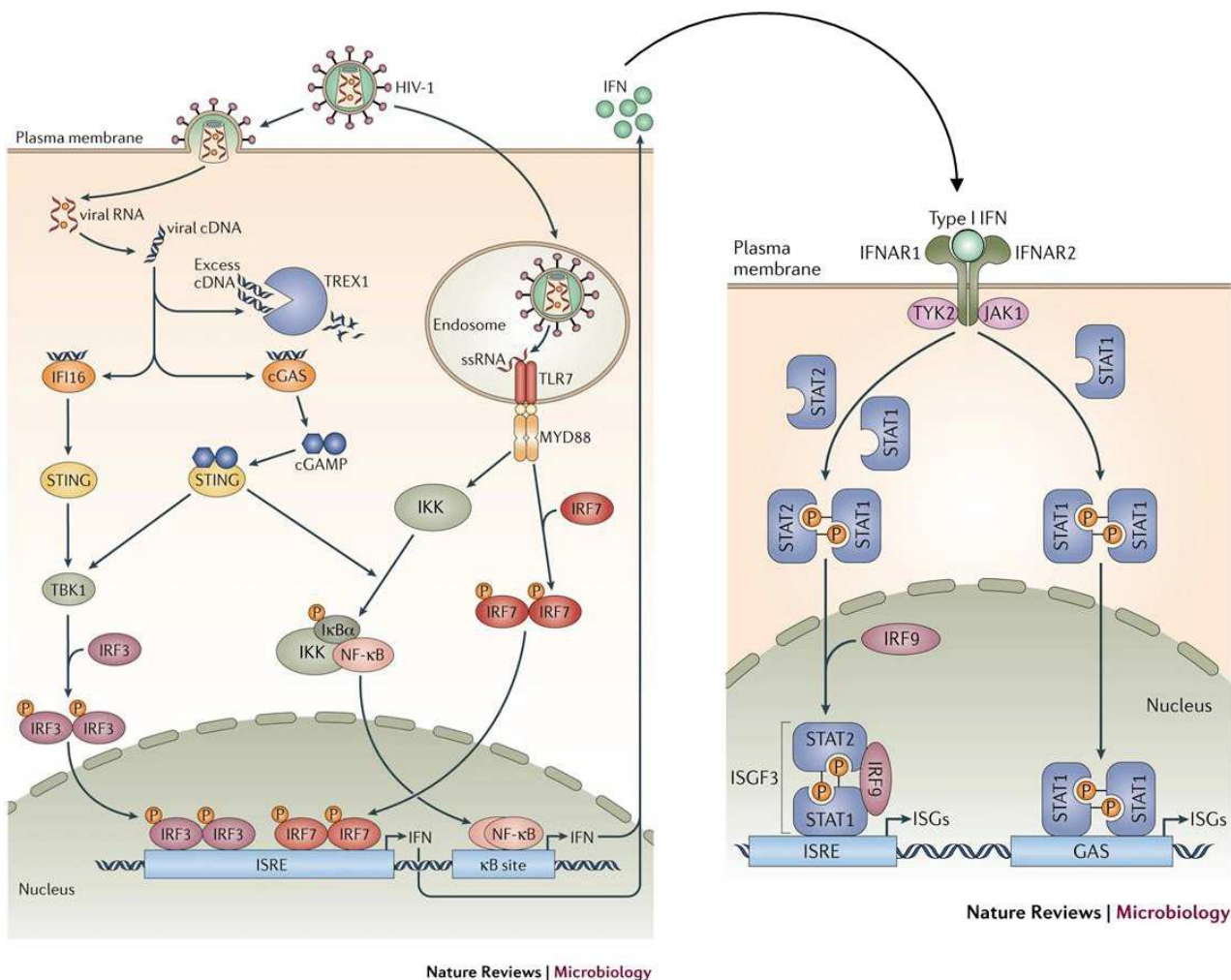


Figure 11 : Réponse immunitaire innée déclenchée par le VIH-1

Au cours de son cycle de réplication, l'ARN viral est rétro-transcrit en un ADNc, détecté par les senseurs cytoplasmiques de l'immunité que sont cGAS et IFI16. La stimulation du récepteur IFI16 active l'adaptateur STING, qui active à son tour la kinase TBK1, responsable de la phosphorylation et de la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF3. IRF3 reconnaît une séquence ISRE et déclenche la production et la sécrétion d'interféron de type I. L'activation du récepteur cGAS suite à la détection l'ADNc viral, provoque la synthèse d'un second messager, cGAMP, qui active alors l'adaptateur STING. Cela entraîne alors la formation d'un complexe composé des protéines TBK1 et IKK, conduisant à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NFκB respectivement. Ces facteurs induisent à leur tour l'expression d'interféron de type I, et de cytokines pro-inflammatoires. Outre l'ADNc viral issu de la transcription inverse, l'ARN simple brin du virus peut également être détecté par le récepteur TLR7 situés dans la membrane des endosomes, particulièrement dans les pDC. La stimulation de TLR7 induit l'activation de Myd88, qui provoque la synthèse d'interféron et de cytokines pro-inflammatoires par le biais des facteurs de transcription IRF7 et NFκB.

L'interféron sécrété en réponse à l'activation des différents senseurs cellulaires peut agir de façon autocrine, sur la cellule productrice, ou paracrine, sur une cellule voisine de la cellule sécrétrice. L'interféron de type I se fixe au récepteur spécifique IFNAR, composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, ce qui active les kinases TYK2 et JAK1. Ces protéines phosphorylent ensuite les protéines STAT, qui se dimérisent, et transloquent dans le noyau. Les hétérodimères STAT1-STAT2 s'associent à IRF9 pour former le complexe ISGF3, qui induit la transcription d'ISG en se fixant aux éléments de réponse ISRE. Les homodimères composés de STAT1 uniquement activent également la transcription d'ISG, en reconnaissant quant à eux une séquence GAS.

D'après (Doyle, Goujon, et Malim 2015)

a. Détection de l'ADN double brin viral

L'étape de transcription inverse est essentielle à la détection du virus par les récepteurs cytosoliques cGAS et IFI16, puisqu'elle permet la transformation de l'ARN viral simple brin en un ADN complémentaire double brin susceptible d'être détecté par ces senseurs (Gao et al. 2013; Lahaye et al. 2013). Le traitement de THP-1, une lignée myéломocytaire, par un inhibiteur de transcription inverse abroge d'ailleurs la production d'IFN déclenchée par cGas (Gao et al. 2013). En effet, ce récepteur décèle la présence de l'ADN viral dans le cytoplasme. Une fois activé, il induit la synthèse de la molécule cGAMP, capable d'interagir et d'activer l'adaptateur STING (*stimulator of interferon genes*). L'activation de la kinase TBK1 par STING provoque la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF3, à l'origine de la production d'interféron de type I (Sun et al. 2013). La protéine STING peut également activer la kinase IKK, qui entraîne la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B, puis la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. En outre, le récepteur cGAS est capable de détecter l'ADN d'autres rétrovirus comme MLV et VIS pour induire la synthèse d'interféron (Gao et al. 2013). L'ADN viral peut également être détecté par le senseur cytosolique IFI16, une protéine induite par l'interféron, dans les macrophages (Jakobsen et al. 2013) ou les LT-CD4 (Monroe et al. 2014). Tout comme cGAS, la reconnaissance de l'ADN viral par IFI16 induit l'activation de la voie de signalisation STING et aboutit à la synthèse d'interféron de type I.

b. Détection de l'ARN viral

Dans certains types cellulaires comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui est un sous-type particulier de cellules dendritiques spécialisé dans la production d'IFN, l'ARN viral simple brin est détecté par TLR7, un PRR endosomal qui appartient à la grande famille des récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-like receptor*) (Beignon et al. 2005). Cette famille de récepteurs compte de nombreux membres partageant une structure commune, capable de reconnaître à la fois des PAMP associés aux bactéries, et d'autres associés aux virus ou champignons. Le domaine central transmembranaire leur confère un ancrage dans les membranes cellulaires, soit en surface associé à la membrane plasmique, soit dans le cytoplasme, associé aux membranes constituant les endosomes, comme c'est le cas pour TLR7 (Figure 11). L'ectodomaine du récepteur reconnaît le signal de danger associé au pathogène infectant l'organisme, et la région intracellulaire appelée TIR, est quant à elle à l'origine du recrutement d'adaptateurs cytoplasmiques impliqués dans la transduction du signal comme Myd88, qui active la production d'interféron α en réponse à la détection de l'ARN (Meier et al. 2007). D'autres senseurs, cytosoliques cette fois, comme RIG-I et MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein*

5) ont également la faculté de détecter l'ARN viral du VIH-1 (Solis et al. 2011). Une fois stimulés, ils sont à l'origine de l'activation d'IRF3 ou d'IRF7 d'une part, ou du complexe NF- κ B d'autre part, déclenchant ainsi la production d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires.

c. Détection d'autres composés viraux

Outre les acides nucléiques détectés au cours des étapes précoces du cycle de réplication viral, les travaux d'une équipe suggèrent que la protéine d'enveloppe gp120 pourrait être détectée par les TLR2/TLR4 dans l'épithélium génital féminin, deux récepteurs détectant habituellement des composants des membranes bactériennes comme les peptidoglycanes et le LPS (Lipopolysaccharide). Suite à la reconnaissance de la gp120, l'activation des récepteurs conduit à la production d'interféron β et de cytokines pro-inflammatoires qui modulent l'intégrité de l'épithélium génital (Nazli et al. 2013, 2019). A contrario, une autre équipe suggère que dans les cellules contenues dans le lait de femmes infectées par le VIH, la seconde protéine d'enveloppe du VIH, la gp41, est reconnue par le récepteur membranaire TLR10, dont le ligand n'est pas encore clairement identifié, et que la cascade de signalisation déclenchée favoriserait l'infection par le virus (Henrick et al. 2019). Ces données n'ont toutefois pas encore été confirmées par d'autres équipes.

d. Stratégies d'échappement mises en place par le virus

Même si les nombreux senseurs présents dans la cellule sont capables de détecter plusieurs composants viraux, le virus a de son côté évolué et développé différentes stratégies afin d'échapper à la détection par ces récepteurs cellulaires. En effet, la majeure partie des composants viraux détectés sont les acides nucléiques issus de la rétrotranscription du génome viral. Ces derniers sont toutefois peu détectés, car protégés par la capsid virale, et donc inaccessibles aux PRR dans le cytoplasme. Cette configuration empêche alors l'activation de la réponse immunitaire innée et la production d'interféron reste donc limitée (Cingöz et Goff 2019; Lahaye et al. 2013). D'autre part, la capsid joue un rôle central dans l'échappement du virus aux PRR de par sa capacité à recruter des facteurs cellulaires comme CypA ou CPSF6 : des mutations de capsid abrogeant l'interaction avec l'un ou l'autre de ces partenaires entraînent la détection du virus par les récepteurs intracellulaires et la production d'interféron qui en découle (Rasaiyaah et al. 2013). En outre, une équipe a montré que la méthyltransférase FTSJ3, dont le rôle est habituellement de méthyliser les ARNm cellulaires pour qu'ils soient reconnus comme tels par la cellule, est recrutée au niveau de l'ARN viral. Une fois l'ARN viral méthylé, il est assimilé à un ARN cellulaire, et échappe donc à la détection par MDA5 (Ringard et al.

2019). Une autre stratégie développée par le virus repose sur l'induction de la dégradation lysosomale du PRR RIG-I par la protéase virale (Solis et al. 2011).

B. Protéines antivirales : les facteurs de restriction et de résistance

Les mammifères étant au contact des virus depuis des millions d'années, la pression de sélection exercée par cette coexistence a favorisé l'émergence et la sélection de gènes codant des protéines capables de contrôler ces infections virales, appelées facteurs de restriction. Ce terme général désigne l'ensemble des protéines cellulaires chargées de limiter la propagation d'un virus, en interférant avec différentes étapes de leur cycle de réplication. En plus de ces critères généraux, ils répondent à tout ou partie des caractéristiques suivantes : ils présentent une expression ubiquitaire et constitutive, augmentée ou non par l'interféron ; ils sont issus de gènes sélectionnés au cours de la coévolution du virus et de son hôte ; et leur activité antivirale est inhibée par une protéine virale (Chougui et al. 2019; Doyle et al. 2015). Cinq facteurs répondent à l'ensemble de ces critères et sont considérés comme des facteurs de restriction : SerinC3/5, TRIM5 α , APOBEC3G, SAMHD1 et Bst2/Tetherin. Les autres facteurs ne répondant qu'à une partie seulement de ces critères sont des facteurs dits de résistance. Si certains de ces facteurs ont une activité relativement restreinte et visent un nombre limité de virus, d'autres bloquent la réplication d'un large spectre de virus, et ciblent un mécanisme conservé, partagé par les différentes cibles. En outre, l'activité restrictive de ces protéines peut être modulée par différentes modifications post-traductionnelles, qui influencent leur localisation, leur stabilité ou leur conformation. Cet ensemble de protéines antivirales constitue l'immunité intrinsèque, troisième pan de l'immunité classiquement divisée en deux grandes catégories, les immunités innée et adaptative.

1. Les facteurs antiviraux ciblant le VIH

De nombreux facteurs antiviraux ont été identifiés au cours des années et ciblent quasiment l'intégralité des étapes du cycle réplcatif du VIH (Figure 12). En contrepartie, le génome du virus code plusieurs protéines capables de contrecarrer ces facteurs cellulaires.

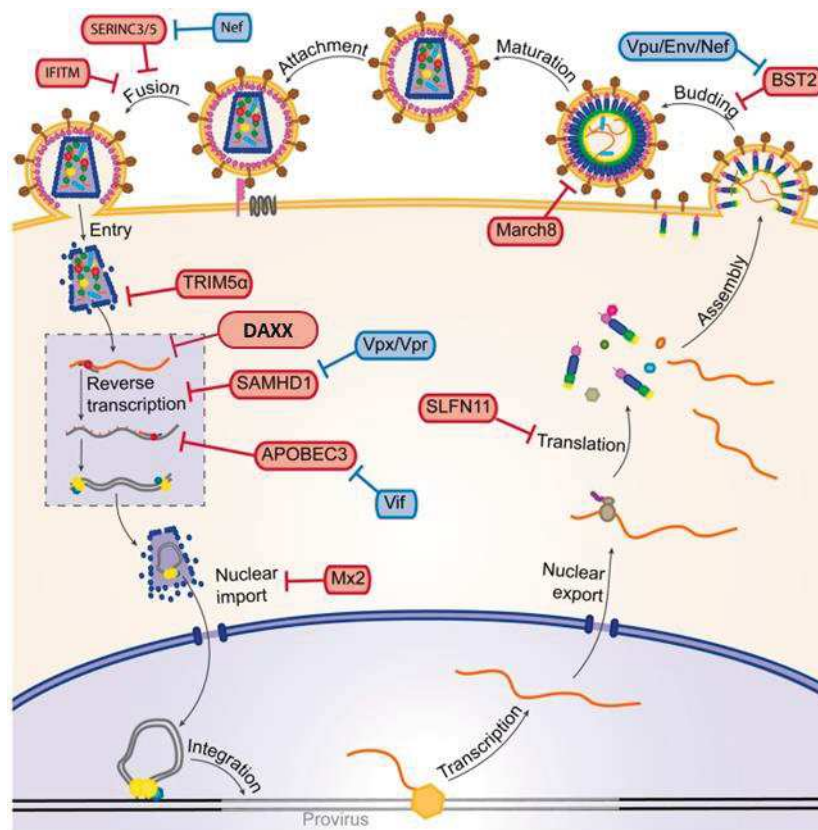


Figure 12 : Les facteurs antiviraux ciblant différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1

Les principaux facteurs de restriction et de résistance ciblant le VIH sont représentés en rouge sur le schéma. Ils exercent leur activité pratiquement à chaque étape du cycle de réplication du virus. En contrepartie, des gènes viraux codant des protéines auxiliaires contrecarrant ces facteurs de restriction ou de résistance, représentés en bleu sur le schéma, ont été sélectionnés par les virus au cours de leur évolution. D'après (Seissler, Marquet, et Paillart 2017)

L'entrée du virus est restreinte par les facteurs de la famille des IFITM ou les protéines SERINC3/5 (Figure 12). La famille des protéines IFITM (*interferon-induced transmembrane protein*) compte cinq membres, IFITM 1 à 5, dont trois possèdent une activité antivirale initialement décrite contre les virus Influenza A, West Nile et Dengue (Brass et al. 2009). Elles sont exprimées en réponse à la production d'interféron de type I ou II, faisant d'elles des produits d'ISG (Brass et al. 2009). Ces protéines transmembranaires sont localisées à la membrane plasmique ou au niveau des endosomes. Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, les protéines IFITM1, 2 et 3 sont incorporées dans les particules virales au cours des étapes tardives du cycle de réplication et inhibent la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'infection suivante (Compton et al. 2014; Lu et al. 2011; Tartour et al. 2014). Par un mécanisme similaire, les SERINC3/5 (*serine incorporator*) inhibent l'entrée du virus (Rosa et al. 2015; Usami et al. 2015). Cet effet antiviral est toutefois bloqué par la protéine auxiliaire Nef (Figure 12). En effet, en diminuant l'expression en surface des protéines SERINC3/5, Nef limite leur incorporation au sein des particules virales nouvellement formées en les séquestrant dans des endosomes, levant ainsi la restriction imposée par les SERINC3/5.

L'étape de la transcription inverse, particulièrement importante et spécifique de la réplication des rétrovirus, est la cible de plusieurs facteurs de restriction et de résistance comme TRIM5 α (Stremlau et al. 2004), APOBEC3G (Sheehy et al. 2002), SAMHD1 (Laguet et al. 2011), ou Daxx (Dutrieux, Maarifi, et al. 2015). Par ailleurs, Mx2 (*myxovirus resistance 2*), un facteur également induit par l'IFN (Aebi et al. 1989), exerce son activité antivirale après la transcription inverse, et avant l'intégration du génome viral à la chromatine cellulaire, vraisemblablement au niveau de l'import nucléaire (Figure 12). En effet, en présence de Mx2, une diminution de la quantité de cercles à 2 LTR ou de l'ADN viral intégré est observée, ce qui suggère un défaut d'import nucléaire ou une déstabilisation de l'ADN viral une fois celui-ci importé dans le noyau (Goujon et al. 2013; Kane et al. 2013). Certains articles montrent que l'activité de restriction de Mx2 pourrait impliquer d'autres facteurs cellulaires ou viraux, comme la CypA (Liu et al. 2013) ou la capsid du virus (Buffone et al. 2015; Kane et al. 2013). Enfin, d'autres facteurs antiviraux tels que HUSH, ZAP, SNLF11, Bst2/Tetherin, ou encore March8 interviennent plus tardivement au cours de cycle de réplication du VIH-1. Le complexe protéique HUSH (*human silencing hub*), antagonisé par la protéine virale Vpx, participe à la répression épigénétique du provirus et à la mise en place et au maintien de la latence (Chougui et al. 2018). Le facteur ZAP (*Zinc finger antiviral protein*) agit contre un large spectre de virus en ciblant les ARNm viraux. Après avoir réprimer la traduction des ARNm viraux, il est à l'origine de leur dégradation grâce au recrutement de la machinerie cellulaire de dégradation des ARNm (Zhu et al. 2011, 2012). SLFN11 (*schlafen family member 11*) inhibe quant à elle la traduction des protéines virales en interagissant avec les ARN de transfert (M. Li et al. 2012), tandis que Bst2 empêche la libération des virions nouvellement formés (Neil et al. 2008). Cet effet antiviral de Bst2 est limité par la protéine virale Vpu, qui diminue la quantité de Bst2 exprimée en surface des cellules productrices de virions (Van Damme et al. 2008) (Figure 12). March8 a un mécanisme légèrement différent, puisqu'il n'influence pas la production de particules virales à proprement parler, mais réduit l'infectivité des particules libérées par la cellule infectée en diminuant l'expression des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 à la surface des cellules productrices (Tada et al. 2015).

2. Les facteurs de restriction ciblant la transcription inverse

a. APOBEC3G

La transcription inverse étant une étape obligatoire par laquelle le virus doit passer pour intégrer son génome à celui de l'hôte, elle constitue une cible privilégiée pour de nombreux facteurs antiviraux. Le premier facteur ciblant la transcription inverse identifié est APOBEC3G (A3G), mis en évidence par

l'intermédiaire de son interaction avec la protéine virale auxiliaire Vif (Sheehy et al. 2002) (Figure 12). Au cours des étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1, A3G est encapsidé grâce à l'interaction qu'il établit avec le domaine NC de la polyprotéine Gag, assemblée à la membrane plasmique (Sheehy et al. 2002; Zennou et al. 2004). A3G appartient à la famille des cytidine désaminase, des enzymes qui catalysent la désamination des cytidines en uridines sur le brin (-) de l'ARN, induisant des mutations de la guanine en adénine sur le génome ADN. Lorsque les virions ayant incorporé A3G infectent une nouvelle cellule, ce dernier provoque de multiples mutations de l'ADN viral synthétisé au cours de la transcription inverse (Mangeat et al. 2003). Ces hypermutations sont à l'origine de la dégradation des rétrotranscrits, bloquant alors le cycle de réplication au niveau de la transcription inverse (Zhang et al. 2003). L'expression d'A3G peut être augmentée en réponse à l'IFN α dans certains types cellulaires, comme les cellules dendritiques, les pDC, ou les macrophages (Peng et al. 2006; Sarkis et al. 2006; Wang et al. 2008). Dans le cas des lymphocytes T, principales cibles de l'infection par le VIH, l'IFN α augmente l'expression d'A3G dans les LT quiescents, mais pas dans les LT activés (K. Chen et al. 2006). L'action antivirale d'A3G est néanmoins entravée par la protéine virale Vif, qui inhibe l'incorporation d'A3G dans les virions. En effet, l'interaction entre Vif et A3G entraîne l'ubiquitination et donc la dégradation protéasomale de ce facteur de restriction (Marin et al. 2003; Sheehy, Gaddis, et Malim 2003).

b. SAMHD1

Le facteur de restriction SAMHD1 a été identifié en 2011, comme étant le facteur permettant aux cellules dendritiques de résister à l'infection par le VIH-1, et aux macrophages de limiter l'infection (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011) (Figure 12). Contrairement à A3G qui est encapsidé et exerce son activité antivirale au cours de l'infection suivante, SAMHD1 interfère avec la transcription inverse dans la cellule initialement infectée, en hydrolysant les dNTP cellulaires en deoxynucléoside et triphosphate inorganique. De ce fait, le stock de dNTP disponible et nécessaire à la transcription inverse du génome viral est drastiquement réduit, au-delà d'un seuil où la RT n'est plus capable d'exercer sa fonction (Goldstone et al. 2011; Lahouassa et al. 2012). L'activité antivirale de SAMHD1 est régulée par la phosphorylation du résidu 592 par le complexe cycline A2/CDK1, actif uniquement dans les cellules en division : lorsque le résidu T592 est phosphorylé, SAMHD1 est inactif (Cribier et al. 2013; White et al. 2013). Ainsi, SAMHD1 a un effet plus que limité dans les lignées cellulaires, ou les LT-CD4 activés en prolifération. En revanche, il est très efficace dans les LT-CD4 quiescents, les cellules dendritiques et les macrophages (Baldauf et al. 2012). Par ailleurs, en plus de son activité d'hydrolyse des dNTP, certains travaux suggèrent que SAMHD1 présente une activité 3'→5' exonucléase à l'origine

de la dégradation de l'ARN viral (Beloglazova et al. 2013; Choi et al. 2015; Ryoo et al. 2014). Cette fonction a toutefois été remise en doute par la suite (Antonucci et al. 2016; Seamon et al. 2015). Comme de nombreux autres facteurs de restriction, l'activité antivirale de SAMHD1 est entravée par une protéine virale, la protéine accessoire Vpx. En effet, cette protéine virale exclusivement exprimée par le VIH-2, entraîne l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de SAMHD1 (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011). Cette propriété explique que le VIH-2 soit insensible à l'activité antivirale de SAMHD1. Bien que le VIH-1 soit dépourvu de la protéine Vpx, il parvient tout de même à se répliquer dans les cellules myéloïdes comme les macrophages. Une équipe a montré que dans ce type cellulaire, la cycline L2 était impliquée dans le recrutement d'un complexe contenant DCAF1, provoquant la dégradation protéasomale de SAMHD1 (Kyei et al. 2015).

c. TRIM5 α

Le facteur de restriction TRIM5 α , dont l'effet contre le VIH-1 a été mis en évidence au début des années 2000, cible également la transcription inverse des rétrovirus (Stremlau et al. 2004). Elle constitue une puissante barrière inter-espèce, puisque la protéine du macaque rhésus a une forte activité restrictive contre le VIH-1 mais pas contre le VIS, tandis que la protéine humaine, inefficace contre le VIH-1, inhibe la réplication du VIS (Stremlau et al. 2004; Yap et al. 2004). Cette vision a toutefois été récemment remise en question, suite à la publication de deux articles montrant que la CypA protégeait le VIH-1 de l'action antivirale exercée par TRIM5 α dans les cellules humaines (Kim et al. 2019; Selyutina et al. 2020). TRIM5 α limite la progression du cycle de réplication viral en déstabilisant précocement les capsides virales entrantes, ce qui provoque l'inhibition de la transcription inverse, ces deux étapes étant étroitement liées l'une à l'autre dans le temps et l'espace (Black et Aiken 2010; Stremlau et al. 2006). TRIM5 α est exprimée de façon ubiquitaire et constitutive, majoritairement dans le cytoplasme où elle forme des corps cytoplasmiques (Campbell et al. 2007; Stremlau et al. 2004), et son expression est augmentée en réponse à l'IFN de type I principalement, faisant de lui le produit d'un ISG (Carthagen et al. 2009; Sakuma, Mael, et Ikeda 2007). Notre équipe a toutefois montré que TRIM5 α pouvait aussi s'accumuler dans le noyau des cellules dendritiques dans certaines conditions (Portilho et al. 2016).

Ce facteur antiviral appartient à la grande famille des protéines TRIM. Ces protéines partagent une structure N-terminale commune de type RBCC et se différencient l'une de l'autre par un domaine C-terminal spécifique. A l'extrémité N-terminale, on trouve en premier lieu un domaine RING (*really interesting new gene*), qui possède une activité E3 ubiquitine ligase, un ou deux domaines B-Box, suivi

d'une région coiled coil, domaines conférant à TRIM5 α la capacité de se multimériser (Javanbakht et al. 2006; Li et Sodroski 2008). TRIM5 α diffère des autres protéines TRIM par son extrémité C-terminale, composée d'une région appelée PRY SPRY, ou B30.2, qui lui permet d'interagir avec les capsides virales entrantes (Figure 13) (Stremlau et al. 2006).

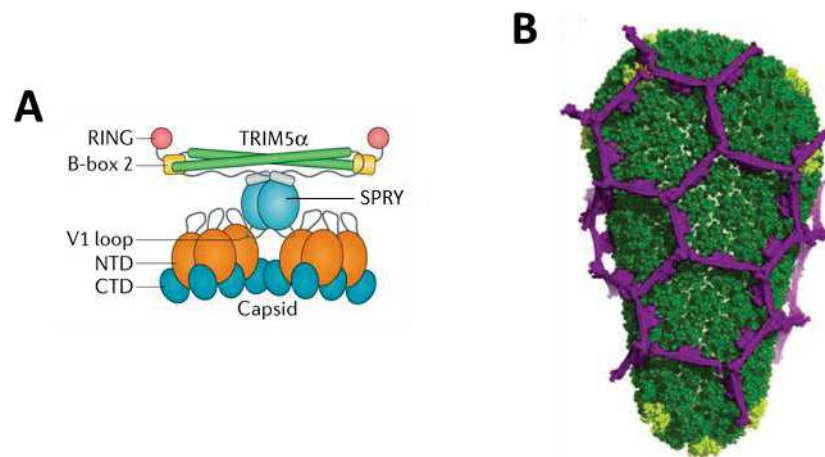


Figure 13 : Schémas de l'interaction entre TRIM5 α et la capside du VIH

A. Lorsque TRIM5 α s'associe sous forme de dimères, les domaines SPRY reconnaissent la capside assemblée du VIH. **B.** Représentation du modèle selon lequel TRIM5 α s'oligomérisent autour de la capside virale pour former une cage et limiter la progression du cycle de réplication.

NTD : domaine N-terminal de la capside. CTD : domaine C-terminal de la capside. D'après (Ganser-Pornillos et Pornillos 2019)

Grâce à ses domaines B-box et coiled coil, TRIM5 α s'oligomérisent, ce qui a pour conséquence d'augmenter son affinité pour la capside (Li et Sodroski 2008). Ainsi, la protéine se structure autour de la capside virale jusqu'à former une cage (Figure 13) (Ganser-Pornillos et al. 2011; Li et al. 2016). L'interaction entre TRIM5 α et la capside s'établit par l'intermédiaire des domaines SPRY et NTD de TRIM5 α et de la capside respectivement. Le domaine SPRY reconnaît en réalité la structure formée par la capside, et non les monomères isolés de capside (Black et Aiken 2010; Stremlau et al. 2006).

L'activité antivirale de TRIM5 α peut être modulée par différentes modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination ou la SUMOylation. Des études suggèrent en effet que l'ubiquitination de TRIM5 α est à l'origine de la dégradation protéasomale de la capside (Campbell et al. 2016; Wu et al. 2006). Il semblerait que le domaine RING, responsable de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRIM5 α , soit à l'origine de son auto-ubiquitination, modification qui semble nécessaire pour que la protéine exerce son activité antivirale (Campbell et al. 2016; Fletcher et al. 2015; Lienlaf et al. 2011). En effet, certains travaux ont montré que la décapsidation précoce, et donc l'inhibition de la transcription inverse, était

perdue lorsque l'auto-ubiquitination de TRIM5 α était inhibée. En outre, d'autres recherches suggèrent que l'auto-ubiquitination de TRIM5 α induite par l'interaction entre ce facteur et la capsidite pourrait déclencher la voie de synthèse de l'interféron, qui contribuerait ainsi au contrôle de l'infection (Fletcher et al. 2015; Pertel et al. 2011). Par ailleurs, notre équipe a publié plusieurs articles décrivant la manière dont la SUMOylation pouvait moduler l'activité antivirale de TRIM5 α (Dutrieux, Portilho, et al. 2015; Portilho et al. 2016). En effet, la SUMOylation de ce facteur de restriction influence la localisation de ce dernier dans les cellules dendritiques : ce n'est qu'une fois SUMOylé que TRIM5 α , alors localisé dans le cytoplasme, exerce son activité inhibitrice (Portilho et al. 2016). De plus, la SUMOylation du résidu lysine en position K84 par l'E3 SUMO ligase RanBP2, une nucléoporine située au niveau des filaments cytoplasmiques du pore nucléaire, favorise l'activité antivirale de TRIM5 α (Maarifi et al. 2018). D'autre part, TRIM5 α contient trois domaines SIM (*SUMO interacting motif*) lui permettant d'interagir avec des partenaires eux-mêmes SUMOylés. Des études montrent que deux de ces trois SIM sont nécessaires à l'activité antivirale de TRIM5 α (Arriagada, Muntean, et Goff 2011).

III. Le processus de SUMOylation

La SUMOylation est une modification post traductionnelle, au même titre que l'acétylation, la phosphorylation ou bien l'ubiquitination. Le processus de SUMOylation se caractérise par une succession de réactions enzymatiques semblables à celles mises en place au cours de l'ubiquitination, qui aboutissent à la liaison covalente de la protéine SUMO (*Small Ubiquitin like Modifier*) sur une lysine acceptrice de la protéine cible.

A. Découverte

Historiquement, le premier article relatant l'existence de SUMO a été publié en 1995 dans le cadre de travaux de recherche menés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : l'équipe a identifié une nouvelle protéine qu'ils baptisent Smt3, capable d'interagir avec Mif2, une protéine qui se retrouve au niveau du centromère des chromosomes de levure (Meluh et Koshland 1995). Un an plus tard, trois équipes indépendantes identifient chez l'homme une protéine qui sera par la suite appelée SUMO, en remarquant des similarités de séquence entre la nouvelle protéine identifiée d'une part, et Smt3 ou l'ubiquitine d'autre part. En recherchant des partenaires associés aux corps nucléaires PML (*promyelocytic leukemia protein*) par crible d'une banque d'ADNc, Boddy et ses collaborateurs identifient PIC-1, une protéine interagissant avec PML (Boddy et al. 1996). Okura et ses collaborateurs identifient la Sentrin par crible double hybride comme un partenaire protégeant la cellule de la mort cellulaire

induite par Fas et le récepteur au TNF (Okura et al. 1996). Enfin, Shen et ses collaborateurs identifient un nouveau partenaire de Rad51 et Rad52, deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, par criblage double hybride et la nomment UBL1 (ubiquitin like 1) (Zhiyuan Shen et al. 1996).

B. Les protéines SUMO

Les protéines SUMO appartiennent à la famille des UBL (Ubiquitin Like Protein). Elles présentent une structure 3D qui ressemble à celle de l'ubiquitine, malgré une homologie de séquence de seulement 18% (Figure 14) (Bayer et al. 1998).

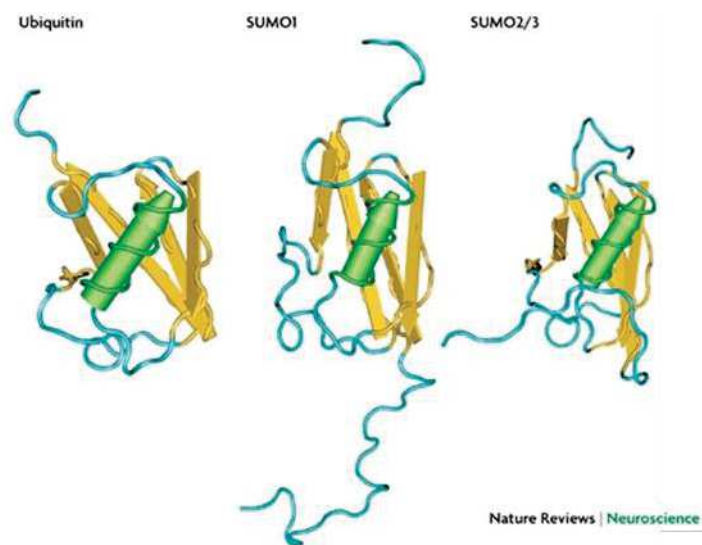


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de SUMO

Ces représentations en ruban comparent la structure tridimensionnelle de l'ubiquitine (UniProt identifiant: 1D3Z), de SUMO1 (UniProt identifiant: 1A5R) et de SUMO2/3 (UniProt identifiant: 2AWT). Les séquences de SUMO2 et SUMO3 sont très proches l'une de l'autre puisqu'elles partagent 95% d'homologie. Malgré une faible homologie de séquence, l'ubiquitine et les protéines SUMO ont des structures 3D proches. (Martin et al. 2007)

Ce sont de petites protéines composées de 101 acides aminés, et d'environ 12 kDa, très conservées chez tous les eucaryotes. Si la levure ne compte qu'un seul gène codant SMT3, il existe cinq paralogues SUMO chez l'homme (Lapenta et al. 1997; Bohren et al. 2004; Guo et al. 2004; Liang et al. 2016), et jusqu'à 8 paralogues chez les plantes (Kurepa et al. 2003). Deux gènes sont dits paralogues lorsqu'ils sont homologues et issus d'un même gène ancestral, et que les gènes résultant de sa duplication ont évolué pour acquérir une nouvelle fonction. SUMO1, SUMO2 et SUMO3 sont les mieux caractérisés à ce jour. Les séquences de SUMO2 et SUMO3 sont très proches et partagent 95% d'identité : leurs séquences ne diffèrent que par trois acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale, il est donc parfois difficile de les discerner l'un de l'autre sur le plan fonctionnel. En revanche, si SUMO1 et

SUMO2/3 partagent une structure 3D similaire (Figure 14), leurs séquences ne sont homologues qu'à 50% (Tatham et al. 2001; Saitoh et Hinchev 2000). SUMO1, SUMO2 et SUMO3 sont exprimés de façon ubiquitaire, tandis que l'expression de SUMO4 ou SUMO5 est plus restreinte, au sein de tissus spécifiques comme les reins, la rate, ou les ganglions lymphatiques pour SUMO4 (Bohren et al. 2004; Guo et al. 2004), et le sang périphérique en ce qui concerne SUMO5 (Liang et al. 2016). Le maintien du pool de SUMO libre mobilisable en réponse à un signal est régulé à la fois par la synthèse de nouvelles protéines SUMO, mais aussi par l'intermédiaire d'enzymes capable de déconjuguer certaines cibles pour libérer SUMO, les SENP (*sentrin specific protease*). C'est particulièrement le cas de SUMO1, qui se trouve majoritairement associé à RanGAP1 et très peu disponible sous forme libre dans les cellules (Matunis, Coutavas, et Blobel 1996), au contraire de SUMO2/3, qui constituent un large pool de protéines SUMO libres, prêt à être mobilisé en réponse à certains signaux (Saitoh et Hinchev 2000). Certaines cibles sont préférentiellement modifiées par l'un des paralogues SUMO, c'est le cas par exemple de RanGAP1 qui se retrouve surtout conjugué à SUMO1 (Saitoh et Hinchev 2000; Zhu et al. 2009). D'autres protéines peuvent toutefois être modifiées indifféremment par SUMO1, 2, ou 3 (Hardeland et al. 2002; Hofmann, Flöss, et Stamminger 2000).

C. Le mécanisme de SUMOylation

Ce mécanisme a été mis en évidence dans le cadre de travaux menés sur la régulation du transport nucléo-cytoplasmique régulé par RanGAP1 (Mahajan et al. 1997; Matunis et al. 1996). Ces travaux montrent le rôle que joue la SUMOylation de RanGAP1 dans le transport à travers le pore nucléaire. La SUMOylation se caractérise par une cascade de réactions enzymatiques comparables à celles aboutissant à l'ubiquitination des protéines. La SUMOylation est un processus qui aboutit à création d'une liaison covalente entre SUMO et le substrat cible (Figure 15).

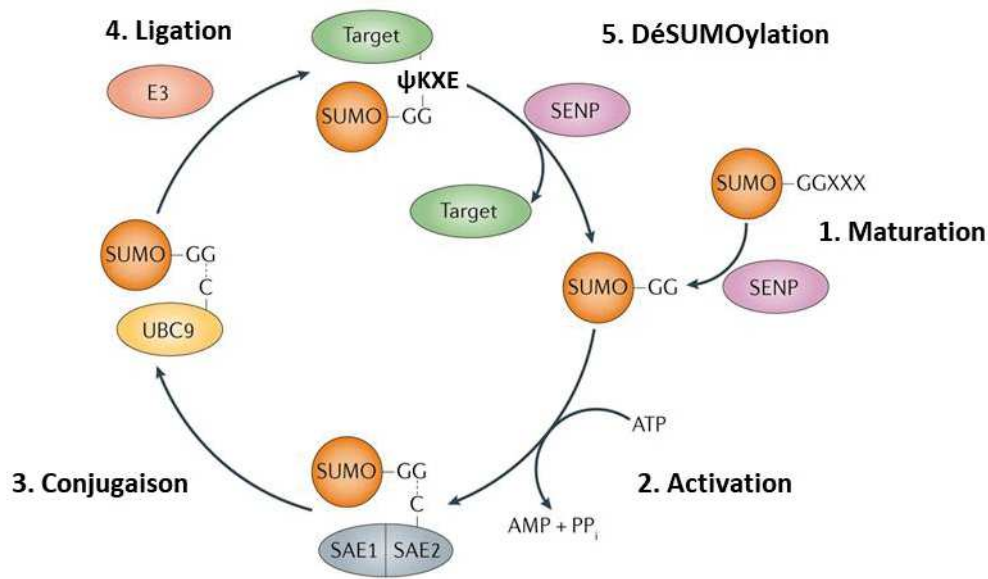


Figure 15 : Cascade enzymatique de SUMOylation

La SUMOylation est un processus faisant intervenir plusieurs enzymes, qui aboutit à la modification d'une protéine cible par SUMO. Au cours d'une première étape de maturation (1), la protéase SENP hydrolyse l'extrémité C-terminale de SUMO afin d'exposer un motif diglycine, nécessaire à l'activation de SUMO. Une fois activée par le dimère SAE1/SAE2 (2), SUMO est transféré à l'enzyme de conjugaison Ubc9 (3). Ubc9 reconnaît ensuite un motif consensus de SUMOylation sur la protéine cible (4). A cette étape, une dernière enzyme facultative, une E3 SUMO ligase peut favoriser la liaison de SUMO à sa protéine cible. La SUMOylation est un processus réversible : les protéases spécifiques de SUMO sont également impliquées dans la déconjugaison de SUMO (5), en plus de la maturation. D'après (Hendriks et Vertegaal 2016)

1. Cascade enzymatique de SUMOylation

On parle de machinerie de SUMOylation puisque plusieurs enzymes interviennent séquentiellement au cours de ce processus. Tout comme la cascade d'ubiquitination, la cascade de SUMOylation fait intervenir trois enzymes clés (Figure 15) : une enzyme d'activation E1, une seconde enzyme de conjugaison E2, et une dernière enzyme, la ligase E3. Les protéines SUMO1, 2 et 3 sont synthétisées sous forme de précurseurs immatures dont l'extrémité C-terminale doit être clivée par l'une des six protéines SENP pour exposer un motif diglycine, nécessaire à la conjugaison de SUMO à sa protéine cible (Kamitani, Nguyen, et Yeh 1997) (Figure 15-1). Dans le cas de SUMO4, il semblerait qu'une proline en position C-terminale empêche la maturation et donc la conjugaison à une protéine cible (Owerbach et al. 2005). L'enzyme d'activation est constituée d'un hétérodimère SAE1/SAE2 (SUMO activating enzyme), et catalyse l'activation ATP-dépendante de SUMO, favorisant le transfert de SUMO à l'enzyme de conjugaison (Johnson et al. 1997; Desterro et al. 1999) (Figure 15-2 et 3). Cette enzyme de conjugaison E2 est appelée Ubc9 : elle joue un rôle essentiel, puisque c'est la seule enzyme de conjugaison qui existe dans la machinerie SUMOylation. Ubc9 peut également jouer le rôle de ligase en catalysant la formation de la liaison entre SUMO et sa cible sans nécessairement l'aide d'une E3

ligase, comme cela est montré dans certaines expériences menées *in vitro* (Desterro et al. 1999; Okuma et al. 1999). Des souris Ubc9 ko ont un phénotype létal au stade embryonnaire, avec un défaut d'organisation du noyau (Nacerddine et al. 2005), ce qui souligne l'importance de cette enzyme. Elle a été découverte d'abord chez la levure (Seufert, Futcher, et Jentsch 1995) avant d'être mise en évidence chez l'homme un an plus tard au cours de travaux menés sur l'étude des partenaires de Rad52, par l'une des trois équipes ayant découvert SUMO quelques années auparavant (Z. Shen et al. 1996). SUMO1 2 et 3 interagissent avec la même affinité avec l'extrémité N-terminale d'Ubc9. Enfin, il existe plusieurs E3 ligases, comme RanBP2 (Pichler et al. 2002) ou certains membres de la famille des protéines PIAS (Kahyo, Nishida, et Yasuda 2001; Sachdev et al. 2001). Ces E3 ligases ont la capacité de lier à la fois Ubc9 et la protéine cible pour stabiliser l'interaction entre ces deux partenaires afin d'améliorer l'efficacité de la conjugaison de SUMO à sa cible, en agissant conjointement avec Ubc9 (Figure 15-4).

La SUMOylation est un processus dynamique et réversible au cours duquel un équilibre entre SUMOylation et désSUMOylation s'établit, en fonction des différents stimuli détectés par la cellule. De manière générale, seule une petite fraction de la protéine cible se retrouve conjuguée à SUMO. Les protéases qui catalysent la désSUMOylation sont les SENP (Figure 15-5). Ces enzymes ont elles aussi été décrites initialement chez la levure (Li et Hochstrasser 2000), et il en existe six chez l'homme : SENP1, 2, 3, 5, 6, 7. En plus de leur fonction de désSUMOylation, elles sont impliquées dans la maturation des précurseurs SUMO. Chaque SENP présente une certaine spécificité de substrat liée d'une part à leur préférence pour l'un des paralogues SUMO, et d'autre part à leur localisation. A l'exception de SENP1 qui ne présente aucune préférence, les autres protéases hydrolysent préférentiellement les liaisons établies par SUMO2/3 et les chaînes polySUMO (Gong et Yeh 2006; Mukhopadhyay et al. 2006; Shen et al. 2009), constituées de la liaison de plusieurs protéines SUMO. La localisation subcellulaire des SENP est modulée par leur extrémité N-terminale. Par exemple, l'extrémité N-terminale de SENP1 contient un signal de localisation nucléaire qui engendre une localisation au niveau du noyau (Bailey et O'Hare 2004). Il existe 3 variants de SENP2, générés par épissage alternatif, et dont les extrémités N-terminales diffèrent : on retrouve ainsi SENP2 sur la face nucléaire du pore nucléaire (Hang et Dasso 2002), dans le cytoplasme (Nishida et al. 2001), ou au niveau des cores nucléaires PML (Best et al. 2002). Les SENP3 et 5 se retrouvent au niveau du nucléole (Gong et Yeh 2006), tandis que SENP6 et 7 sont plutôt localisés dans le nucléoplasme (Shen et al. 2009). Dans le cas de PML par exemple, SENP2 désumoyle SUMO1 (Best et al. 2002), alors que SENP6/7 ciblent préférentiellement les chaînes polySUMO2/3 de PML (Mukhopadhyay et al. 2006; Shen et al. 2009).

2. Motif consensus de SUMOylation

Au cours de la SUMOylation, une liaison isopeptidique s'établit entre le motif diglycine à l'extrémité C-terminale de SUMO et une lysine acceptrice contenue dans une séquence particulière de la protéine cible. Dans la plupart des cas, la conjugaison de SUMO se produit au niveau d'une séquence consensus ψ KXD/E, reconnue par l'enzyme de conjugaison Ubc9, où ψ représente un résidu hydrophobe, K correspond à la lysine sur laquelle se liera SUMO, X désigne n'importe quel acide aminé, et peut être suivi soit par l'acide aspartique (D) soit par l'acide glutamique (E) (Rodriguez, Dargemont, et Hay 2001; Sampson, Wang, et Matunis 2001). Ubc9 peut également reconnaître des motifs légèrement différents, au niveau de sites consensus élargis, puisque certaines protéines SUMOylées ne contiennent pas le motif consensus évoqué précédemment. Ces sites non consensus peuvent se situer à proximité d'un groupement d'acides aminés hydrophobes (Matic et al. 2010) ou d'une région riche en acides aminés chargés négativement (Yang et al. 2006). Parmi les sites non consensus, on retrouve la séquence consensus inversée ou encore un motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation, appelé pSUM (Hietakangas et al. 2006). SUMO2 et SUMO3 contiennent eux-mêmes des sites de SUMOylation au niveau de leur extrémité N-terminale, provoquant ainsi la formation de chaînes polySUMO, principalement par l'intermédiaire de la conjugaison de la lysine en position 11 de la protéine SUMO (Tatham et al. 2001) (Figure 16). La séquence de SUMO1 ne contenant pas ce type de site de SUMOylation, il sert dans ce contexte de terminateur de chaîne (Matic et al. 2008).

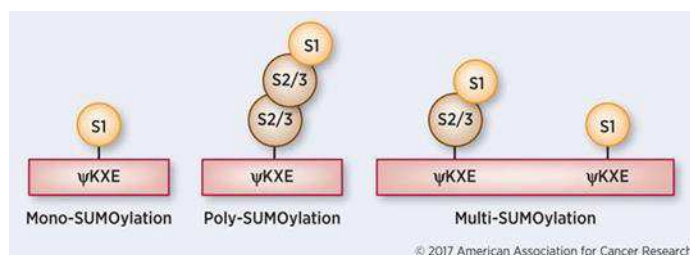


Figure 16 : Formation de chaînes polySUMO

La liaison de SUMO à une protéine cible s'établit entre la lysine de cette protéine, contenue dans une séquence consensus particulière, et SUMO. SUMO2 et 3 contenant eux-mêmes des lysines internes SUMOylables, elles peuvent former de longues chaînes polySUMO. En revanche, SUMO1 ne contenant pas ce type de motif, il sert dans ce contexte de terminateur de chaîne. En outre, une même protéine peut être modifiée par SUMO sur différentes lysines. On parle dans ce cas de multiSUMOylation. D'après (Rabellino, Andreani, et Scaglioni 2017)

D. Autre type de liaison dépendante de SUMO

Les protéines SUMO peuvent également être à l'origine de l'interaction non covalente entre une protéine contenant un motif particulier appelé SIM (SUMO-interacting motif) et un partenaire

SUMOylé (Song et al. 2004). Les domaines SIM sont des motifs riches en acides aminés hydrophobes, flanqués de résidus acides ou pouvant être phosphorylés pour générer des charges négatives (Hecker et al. 2006). Leur existence a été mise en évidence grâce à l'étude de RanBP2 : cette dernière contient un site de liaison à SUMO1, ce qui facilite l'interaction de RanBP2 avec Ubc9-SUMO1 et favorise ainsi la formation d'un complexe E2-E3-SUMO aboutissant à la SUMOylation d'un substrat (Tatham et al. 2005). Depuis, des régions SIM ont été retrouvées dans un très grand nombre de protéines, comme Daxx (Lin et al. 2006) ou PML (Shen et al. 2006). Ce type d'interaction est particulièrement observée dans le cadre de la SUMOylation collective de plusieurs protéines présentes au sein d'un même complexe et impliquées dans un processus biologique nécessitant l'action synchronisée et concertée de plusieurs facteurs, comme la réparation de l'ADN ou de remodelage de la chromatine (Jentsch et Psakhye 2013). On parle alors de SUMOylation en masse.

E. Rôle de la SUMOylation

D'un point de vue moléculaire, la SUMOylation peut avoir des conséquences distinctes et non exclusives sur la protéine qu'elle modifie (Figure 17).

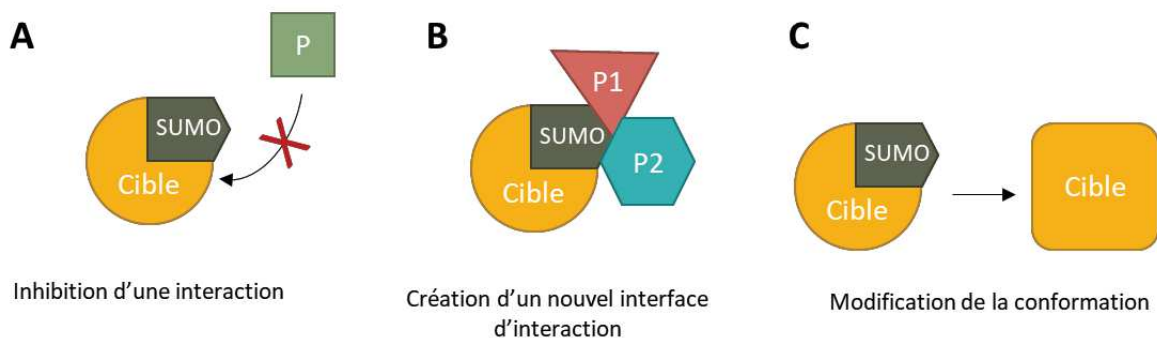


Figure 17 : Conséquences de la SUMOylation

La modification d'une cible par SUMO peut avoir différentes conséquences au niveau moléculaire : une inhibition de l'interaction avec un autre partenaire (A), la création d'une nouvelle interface permettant de recrutement de plusieurs autres protéines (B), ou encore le changement conformationnel de la protéine cible (C).

P : partenaire

La conjugaison de SUMO à une cible peut d'une part empêcher la fixation d'une autre protéine, en bloquant le site d'interaction avec ce troisième partenaire (Figure 17-A). C'est par exemple ce qui se passe dans le cas de l'interaction entre l'E1 et l'E2 ubiquitine ligase 25K : la SUMOylation de cette E2 interfère avec la fixation de l'E1, diminuant ainsi l'ubiquitination des protéines cibles (Pichler et al. 2005). Une compétition peut également apparaître entre SUMO et l'ubiquitine, lorsque la même lysine est ciblée par ces deux modifications. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois au

cours de l'étude de la régulation du facteur I κ B- α : la lysine K21 peut être modifiée soit par SUMO, soit par l'ubiquitine, ces deux modifications ayant des effets antagonistes sur la stabilité de la protéine (Desterro, Rodriguez, et Hay 1998). D'autre part, la fixation de SUMO à sa cible peut générer une nouvelle interface permettant le recrutement et l'interaction de plusieurs protéines, et favorisant ainsi la formation de complexes multiprotéiques (Figure 17-B). Dans ce contexte, la SUMOylation pourrait renforcer l'interaction entre deux protéines interagissant déjà avec une faible affinité. SUMO agit comme une « glue » qui garderait les composants d'un complexe multiprotéique agglomérés les uns aux autres par l'intermédiaire des liaisons intermoléculaires qui s'établissent entre SUMO et les régions SIM des différentes protéines. Ce phénomène est par exemple observé au sein des corps nucléaires PML: le recrutement d'Ubc9 au sein de ces structures favorise la SUMOylation de PML, puis l'association de partenaires par l'intermédiaire de leur domaine SIM (Sahin et al. 2014). Enfin, la SUMOylation peut engendrer une modification de la conformation et donc de la fonction de la protéine ciblée (Figure 17-C). C'est de cette façon que SUMO1 régule l'activité de la thymidine glycosylase TDG, une protéine impliquée dans la réparation des mésappariements de l'ADN, en modifiant sa conformation (Smet-Nocca et al. 2011).

En outre, comme nous l'avons évoqué précédemment, la SUMOylation est un processus réversible : une cible SUMOylée à un instant donné est rapidement désSUMOylée par l'intermédiaire des SENP et de ce fait, seule une fraction de la protéine cible est SUMOylée. Pourtant, les conséquences fonctionnelles associées à cette forme modifiée sont importantes et persistent dans la cellule malgré cette désSUMOylation. Par exemple, la SUMOylation du facteur de transcription Elk1 provoque le recrutement de HDAC2, qui induit la déacétylation des histones à proximité du promoteur du facteur de transcription, et donc la répression des gènes cibles de Elk1. Cette marque associée à la chromatine condensée et inactive persiste malgré la désSUMOylation de Elk1 (Yang et Sharrocks 2004).

Ainsi, en modulant la stabilité, la localisation ou les interactions entre les protéines qu'elle modifie, la SUMOylation est impliquée dans divers processus biologiques allant de l'apoptose à la régulation de la transcription (Rosonina et al. 2017), en passant par la défense contre différents agents pathogènes.

F. Les corps nucléaires PML

Les corps nucléaires PML (CN PML) sont des structures nucléaires dépourvues de membranes, constituées par l'agrégation de différentes protéines, dont PML, aussi appelé TRIM19, régit la formation (Sahin et al. 2014) (Figure 18). PML a initialement été identifiée sous la forme d'une protéine

de fusion avec le récepteur à l'acide rétinoïque α (RAR α), issue d'une translocation entre les chromosomes 15 et 17 (de Thé et al. 1990). Ces structures nucléaires sont particulièrement sensibles aux différents stimuli détectés par la cellule, qui perturbent la formation de ces corps et donc l'ensemble des fonctions qui leurs sont associées, comme l'apoptose (Bernardi et Pandolfi 2003) la maintenance de l'intégrité du génome (Chang et al. 2018), ou la lutte contre les infections virales (Nisole, Stoye, et Saïb 2005).

Comme toutes les protéines de la famille des TRIM, la structure de PML contient les domaines caractéristiques RBCC, (RING, B-Box et coiled coil), qui permettent à PML de s'oligomériser pour constituer les corps nucléaires (Fagioli et al. 1998) (Figure 18). Il existe sept isoformes de PML, générés par épissage alternatif, qui diffèrent par leur domaine C-terminal (Nisole et al. 2013). Si la plupart des isoformes ont une localisation nucléaire, certaines peuvent également présenter une localisation cytoplasmique. C'est par exemple le cas de PML VII, qui est dépourvu de signal de localisation nucléaire, ou bien de PML I, dont la séquence contient un signal d'export nucléaire (Lin, Bergmann, et Pandolfi 2004; Nisole et al. 2013). PML est SUMOylé au niveau de trois lysines acceptrices, K65, K160, K490 (Kamitani et al. 1998). Sa SUMOylation n'est toutefois pas nécessaire à la formation des corps nucléaires, puisqu'un mutant non SUMOylable de PML ne perd pas sa capacité à générer les structures nucléaires (Sahin et al. 2014). En revanche, il ne parvient plus à recruter les partenaires habituellement retrouvés au sein des corps nucléaires (Ishov et al. 1999; Zhong et al. 2000).

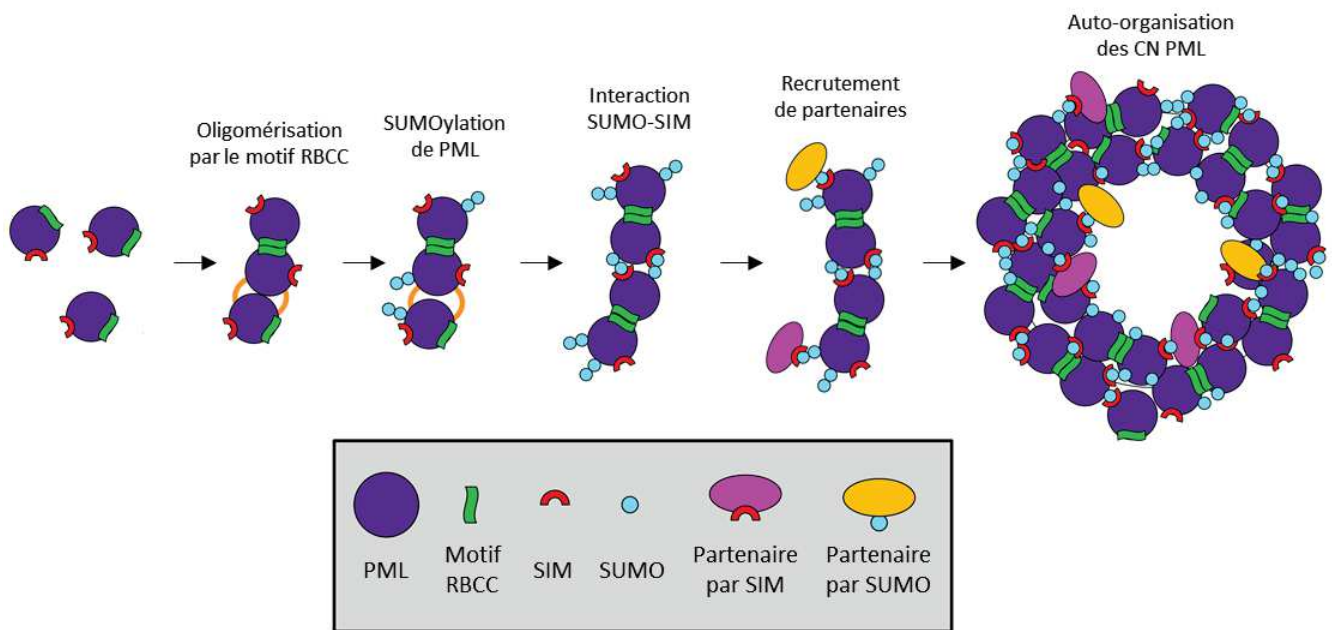


Figure 18 : Formation des corps nucléaires PML

La formation des corps nucléaires PML (CN PML) débute par l'oligomérisation des protéines PML, par l'intermédiaire de leur domaine RBCC (RIN, B-box, Coiled-coil). L'enzyme de conjugaison Ubc9 est ensuite recrutée et favorise la SUMOylation de PML. Ces modifications SUMO interagissent avec les régions SIM de PML, pour former de gros agrégats. Les partenaires de PML sont recrutés au sein de ces structures soit par leur SIM, qui interagit avec la protéine SUMO de PML, soit par l'intermédiaire de la protéine SUMO qui leur est associée et qui interagit avec les régions SIM de PML. D'après (Hoischen et al. 2018)

Ces CN PML sont donc des structures dynamiques, capable de recruter une multitude de partenaires (Van Damme et al. 2010) (Figure 18). Parmi les protéines recrutées au sein de corps nucléaire PML, il faut distinguer celles qui le sont de façon transitoire, qui s'accumulent au sein de ces structures en réponse à un stimulus, de celle qui y résident de manière constitutive, comme peuvent l'être PML, Daxx, ou Sp100. C'est par l'intermédiaire d'interactions entre les régions SIM et SUMO des protéines recrutées que ces structures se forment (Shen et al. 2006). La composition varie en effet en fonction de différents facteurs, comme le type cellulaire, ou le cycle cellulaire (Bernardi et Pandolfi 2007). L'intégrité de ces CN PML est particulièrement sensibles aux stress détectés par la cellule, et provoqués par les infections virales, les cassures d'ADN, ou le stress oxydatif (Bernardi et Pandolfi 2007). PML recrute de nombreux partenaires associés à une fonction commune, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant pour Daxx et ATRX (Ishov, Vladimirova, et Maul 2004) ou le complexe d'histones H3.3-H4 (Delbarre et al. 2013). D'autre part, en recrutant diverses protéines de la machinerie de SUMOylation, ainsi que de multiples protéines SUMOylables, les corps PML constituent des « hotspots » de SUMOylation (Sahin et al. 2014; Van Damme et al. 2010).

De par leur capacité à interagir avec un très grand nombre de partenaires, les CN PML ont été impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la transcription ou la lutte contre les

infections (Bernardi et Pandolfi 2007). Par ailleurs, ces structures pourraient être impliquées dans la latence de certains virus comme HSV-1 (Cohen et al. 2018) ou VIH-1 (Lusic et al. 2013), par l'intermédiaire du rôle qu'ils exercent dans le remodelage de la chromatine. Un rôle de PML dans le maintien de la latence du VIH-1 a en effet été mis en évidence : il semblerait que les corps PML s'associent au provirus pour favoriser l'incorporation de variants d'histones H3.3 méthylés, synonyme de répression transcriptionnelle (Lusic et al. 2013; Masroori, Merindol, et Berthoux 2016).

IV. La protéine Daxx

La protéine Daxx a été identifiée dans un crible double hybride comme l'un des partenaires du récepteur de mort Fas. Cette découverte est d'ailleurs à l'origine de son nom : *Death domain-associated protein 6* (Yang et al. 1997). Depuis, de nombreux travaux étudient la fonction et la localisation de cette protéine très conservée au cours de l'évolution, exprimées de façon ubiquitaire et associée à de nombreuses fonctions cellulaires.

A. Fonction

Daxx est une protéine multifonctionnelle impliquée dans divers processus biologiques comme l'apoptose ou la répression transcriptionnelle (Figure 19). C'est une protéine chaperonne, c'est-à-dire qu'il exerce son activité en se liant à d'autres protéines, participant ainsi à la régulation des différents mécanismes biologiques assuré par ces partenaires. Cette particularité explique en partie la longue liste de partenaires associés à Daxx identifiés à ce jour. La fonction de Daxx dépend principalement de sa localisation subcellulaire, et donc de sa capacité à interagir avec l'un ou l'autre de ses cofacteurs.

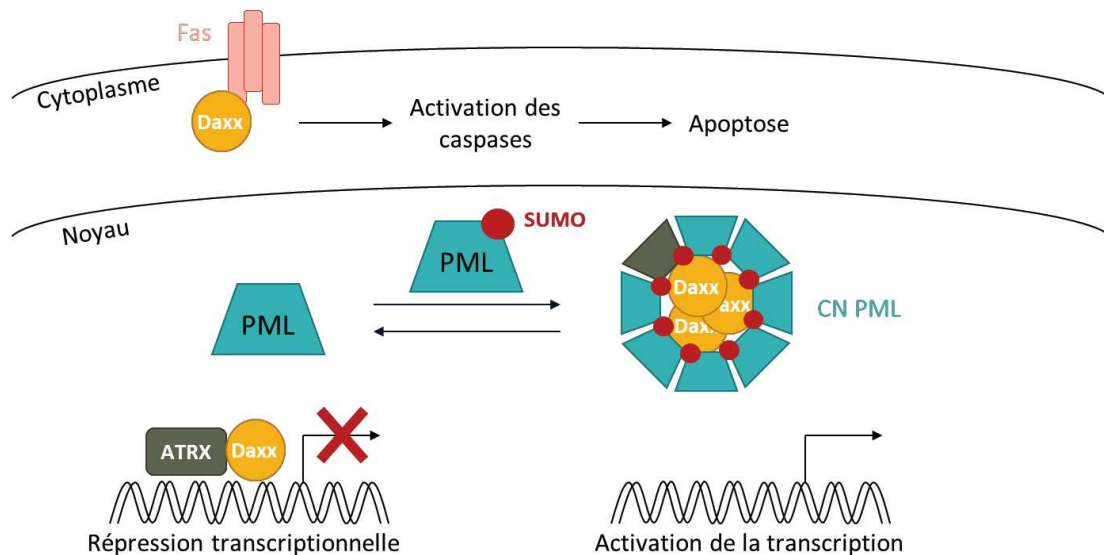


Figure 19 : Principales localisations subcellulaires et fonctions de Daxx

Dans le cytoplasme, Daxx a été identifiée comme un ligand de Fas. Dans le noyau, Daxx est principalement localisé au sein des CN PML, où elle est recrutée par la forme SUMOylée de PML. Lorsqu'il n'interagit pas avec PML, Daxx est localisé au niveau de l'hétérochromatine où il forme un complexe de répression de la transcription avec la protéine ATRX. La séquestration de Daxx par PML l'empêche d'exercer son activité de répresseur transcriptionnel. (Maillet et Nisole 2016)

1. Apoptose

L'apoptose étant un phénomène de mort cellulaire programmée initiée en réponse à la détection de signaux particuliers, il est nécessaire que les facteurs déclenchant ce processus soient finement contrôlés par la cellule. Daxx fait partie de ces protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose. Suite à sa découverte comme partenaire du récepteur de mort Fas, Daxx a été associé à une fonction pro-apoptotique (Yang et al. 1997) : il fait le lien entre le récepteur de mort et la kinase JNK pour déclencher l'apoptose, bien que ce résultat ait été par la suite réfuté dans d'autres travaux (Torii et al. 1999). Lorsque le récepteur Fas est stimulé, l'association de Daxx et ASK1 dans le cytoplasme induit la phosphorylation de Daxx, puis active la voie JNK et aboutit à une apoptose indépendante des caspases (Chang et al. 1998). La voie apoptotique JNK peut également être activée en réponse à la stimulation du récepteur au TGF- β , auquel s'associe Daxx dans certaines conditions de stress (Perlman et al. 2001). En outre, Daxx pourrait réguler l'apoptose en modulant l'expression de gènes pro- ou anti-apoptotiques dans le noyau. Lorsque les cellules subissent une irradiation aux ultra-violets par exemple, Daxx interagit avec l'Axin, une protéine principalement impliquée dans la régulation de la voie de signalisation Wnt- β Catenin, et stimule la phosphorylation du facteur de transcription p53 par la kinase HIPK2. Un fois phosphorylé, p53 active la transcription de gènes pro-apoptotiques (Li et al. 2007). Même si Daxx a été majoritairement associé à une activité pro-apoptotique, d'autres travaux

révèlent l'effet inverse : chez des souris déficientes pour le gène Daxx, une apoptose massive est observée et mène à une létalité au stade embryonnaire (Michaelson et al. 1999). Ces résultats suggèrent donc que Daxx aurait un rôle protecteur contre l'apoptose au cours du développement embryonnaire. Des recherches menées dans des lymphocytes T montrent quant à eux que Daxx protège ces cellules de la mort cellulaire induite par la stimulation du récepteur TCR (T cell receptor) (J. Li et al. 2017). Le rôle de Daxx dans l'apoptose n'est donc pas clairement établi : il peut favoriser ou empêcher l'apoptose en fonction du type cellulaire, des stimuli détectés et des partenaires auxquels il s'associe (Salomoni et Khelifi 2006).

2. Répression transcriptionnelle

Malgré un rôle dans l'apoptose très documenté, la fonction principale de Daxx est celle de répresseur transcriptionnel. Il exerce cette activité au travers de différents moyens, en liant des facteurs de transcription, ou en interagissant avec d'autres protéines nucléaires impliquées dans le remodelage de la chromatine ou les modifications épigénétiques (Figure 20).

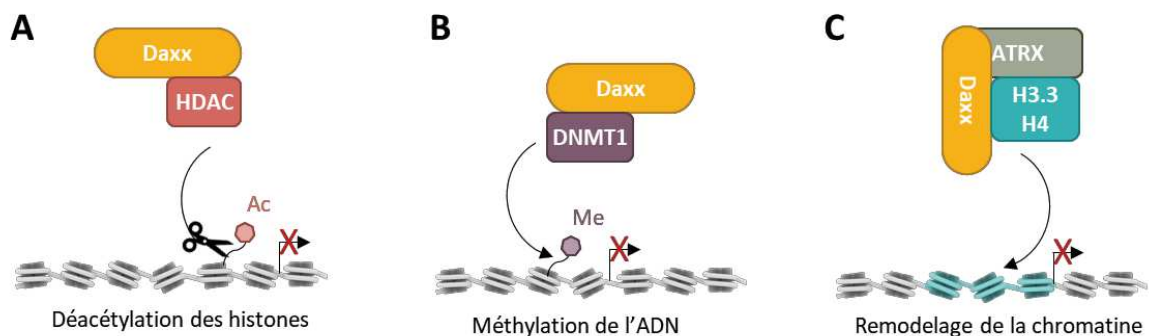


Figure 20 : Répression transcriptionnelle exercée par Daxx

A. En interagissant avec les histones déacétylases HDAC1 ou HDAC2, Daxx provoque la déacétylation des histones et réprime l'expression des gènes. Ac : groupement acétyl **B.** L'ADN méthyltransférase DNMT1 induit la méthylation de l'ADN, marque associée à la chromatine transcriptionnellement inactive. Me : groupement méthyl **C.** Le complexe formé par l'association de Daxx et ATRX favorise l'incorporation du variant d'histone H3.3, synonyme de répression transcriptionnelle.

Si certains travaux ont montré que Daxx ne s'associait pas directement avec l'ADN (Hollenbach et al. 1999), il peut en revanche interagir avec certains facteurs de transcription et réprimer les gènes dont ils contrôlent l'expression. Le rôle de répresseur transcriptionnel a pour la première fois été évoqué lors de la mise en évidence d'une interaction entre Daxx et la facteur de transcription Pax3, qui entraîne une réduction de l'activité transcriptionnelle de ce dernier d'environ 80% (Hollenbach et al. 1999). Depuis, d'autres articles ont montré que Daxx pouvait s'associer à un grand nombre de facteurs

de transcription comme p53 (Zhao et al. 2004), Stat3 (Muromoto et al. 2006) ou encore p65 (Park et al. 2007). Cette activité de répression transcriptionnelle peut être régulée par la SUMOylation : par exemple, une interaction s'établit entre la région SIM de Daxx et la forme SUMOylée du facteur de transcription Smad4 provoquant une inhibition de la transcription dépendante de SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Chang et al. 2005). D'autres articles montrent quant à eux qu'en contrôlant la localisation de Daxx, la SUMOylation module l'activité répressive de Daxx (Li et al. 2000). Lorsque PML est SUMOylé, Daxx est séquestré au sein des CN PML et n'est donc plus associé au facteur de transcription Pax3, ce qui lève l'inhibition de la transcription induite par Daxx (Lehembre et al. 2001).

En plus de se lier à différents facteurs de transcription, Daxx peut également moduler la transcription en induisant des modifications épigénétiques de la chromatine, comme la déacétylation des histones en interagissant avec les histones déacétylases HDAC1 ou HDAC2, ou la méthylation de l'ADN, par l'intermédiaire de son association avec les protéines de la famille des ADN méthyltransférases DNMT1 (Figure 20). Une équipe suggère que Daxx a la capacité d'interagir avec HDAC2 et différents histones, et que cette interaction dépendrait de l'état de phosphorylation de Daxx (Hollenbach et al. 2002). Un autre article montre en effet que la phosphorylation de la sérine en position 669 par la kinase HIPK1 diminue la répression de la transcription induite par Daxx (Ecsedy, Michaelson, et Leder 2003). De plus, les travaux de Morozov et ses collaborateurs suggèrent que Daxx recrute HDAC2 au niveau du promoteur du proto-oncogène c-Met, ce qui provoquerait une diminution de l'acétylation de l'histone H4, un marqueur associé à une forme active de la chromatine, et réprimerait la transcription de c-Met (Morozov et al. 2008). Dans le cadre de la répression induite par le recrutement de protéines associées à l'ADN, la SUMOylation influence l'activité répresser transcriptionnelle de Daxx, en contrôlant sa capacité à interagir avec différents partenaires. En effet, Daxx lie la forme SUMOylée de CBP (CREB-binding protein), un coactivateur transcriptionnel, provoquant ainsi le recrutement de HDAC2 et interférant avec l'activation de la transcription (Kuo et al. 2005). En outre, d'autres recherches ont montré qu'un complexe contenant Daxx et HDAC1 entre autre pouvait réprimer l'expression d'un rétrovirus endogène murin (Hoelper et al. 2017). En interagissant avec un autre type de protéines, la DNMT1, Daxx induit la méthylation de la chromatine située au niveau du promoteur ciblé par le facteur de transcription NFκB (Puto et Reed 2008).

Enfin, Daxx peut exercer sa fonction de répresser transcriptionnel en interagissant avec des protéines chaperonnes associées à la chromatine comme ATRX (*α-thalassemia/mental retardation, X-linked syndrome*) (Xue et al. 2003) (Figure 20), qui se lie à la région riche en hélices α de Daxx. (Tang et al. 2004) pour réprimer la transcription de gènes cibles. Si ATRX reste localisé au niveau de l'hétérochromatine tout au long du cycle cellulaire, Daxx n'y est recruté qu'en phase S. En outre,

l'interaction qui s'établit entre Daxx et ATRX confère à ce dernier une seconde localisation nucléaire, puisqu'il peut alors être recruté au niveau des corps PML par l'intermédiaire de sa liaison avec Daxx (Ishov et al. 2004). Le complexe composé de ces deux protéines permet l'incorporation du dimère d'histones H3.3-H4 au niveau de la chromatine centromérique et télomérique, régions transcriptionnellement inactives, contrairement à la chaperonne HIRA, qui est responsable de l'incorporation du variant H3.3 au niveau de régions transcriptionnellement actives (Drané et al. 2010; Goldberg et al. 2010; Lewis et al. 2010). Le complexe Daxx-ATRX peut par exemple recruter le variant d'histone H3.3 qui, une fois méthylé, réprime les éléments rétroviraux endogènes au cours du développement embryonnaire (Elsässer et al. 2015).

De par ses activités de régulation de l'apoptose et de répression de l'activité transcriptionnelle de certains gènes, Daxx peut être impliqué dans différentes pathologies et principalement dans la progression des cancers lorsque l'une de ces activités est dérégulée. En effet, dans de nombreux cancers, la surexpression de Daxx est associée à la tumorigénèse, la progression de la maladie, et la résistance aux différents traitements (Mahmud et Liao 2019; Shi, Wen, et Shi 2017).

3. Facteur de résistance

Le rôle de Daxx dans la lutte contre les infections virales est développé dans la revue présentée en annexe et publiée en 2016. C'est principalement grâce à son activité de répresseur transcriptionnel que Daxx exerce son activité antivirale. Son rôle contre les virus à ADN comme EBV, CMV ou les herpesvirus est particulièrement documenté.

Si on se focalise sur le lien entre Daxx et le VIH-1, un article a montré par crible double hybride que Daxx pouvait interagir avec la protéine virale p6, sans qu'aucun rôle fonctionnel ne soit associé à cette interaction (Gurer, Berthoux, et Luban 2005). D'autres travaux suggèrent que Daxx s'associe avec l'IN du VIH-1 pour réprimer l'expression des gènes viraux, une fois le génome viral intégré à la chromatine cellulaire, en recrutant des histones déacétylases au niveau du provirus (Huang et al. 2008). Un mécanisme similaire avait déjà été évoqué dans le cadre de travaux menés sur l'intégrase d'un autre rétrovirus, l'Avian Sarcoma Virus (ASV) (Greger et al. 2005). Il est intéressant de noter que ces deux protéines, p6 et IN, sont les seules protéines du VIH-1 identifiées à ce jour comme étant modifiées par SUMO (Gurer et al. 2005; Z. Li et al. 2012; Zamborlini et al. 2011). Un article paru plus récemment montre de surcroît que l'IN contient deux motifs SIM, qui paraissent important pour le cycle de réplication viral puisqu'une mutation de l'un de ces sites entraîne un défaut d'infectivité au cours de l'une des étapes précoces (Zheng et al. 2019). Des études complémentaires permettraient de

caractériser ces interactions, et en particulier de déterminer si la SUMOylation de ces facteurs viraux d'une part, et la région SIM de Daxx d'autre part sont impliquées dans l'interaction liant ces différents cofacteurs.

B. Localisation

Si la première évocation de Daxx suggère une localisation cytoplasmique de la protéine de par sa capacité à interagir avec le domaine de mort du récepteur Fas, elle s'est finalement révélée être majoritairement exprimée dans le noyau. Dans ce compartiment cellulaire, Daxx peut se retrouver associé à la chromatine ou recruté au sein des corps nucléaires PML (Ishov et al. 1999; Torii et al. 1999). Ainsi, la localisation de Daxx est modulée par sa faculté à interagir avec ses différents partenaires (Figure 19).

1. Cytoplasme

L'interaction entre Daxx et le récepteur Fas suggère une localisation cytoplasmique de Daxx, à proximité de la membrane plasmique (Yang et al. 1997). Par la suite, plusieurs travaux utilisant des techniques de fractionnement subcellulaire ou d'immunofluorescence, s'accordent sur une localisation très majoritairement nucléaire (Pluta, Earnshaw, et Goldberg 1998; Lalioti et al. 2002). La localisation cytoplasmique a malgré tout été confirmée par la mise en évidence de l'interaction entre Daxx et ASK1, une protéine impliquée dans la voie apoptotique (Ko et al. 2001). En outre, quelques articles suggèrent que, dans certaines conditions, Daxx serait relocalisé du noyau vers le cytoplasme (Song et Lee 2003; Tanaka et Kamitani 2010). C'est par exemple ce qui a été observé dans le cas du stress induit par le manque de glucose : Daxx est relocalisé dans le cytoplasme pour favoriser la survie des cellules (Song et Lee 2003), bien qu'une autre étude ait par la suite contredit ce résultat (Lindsay, Giovinazzi, et Ishov 2009).

2. La chromatine

Dans le noyau, Daxx peut être localisé au niveau de la chromatine. Les premières expériences suggérant une telle localisation montrent une interaction entre Daxx de multiples protéines associées à la chromatine comme les histones, HDAC2 et Dek (Hollenbach et al. 2002). Par la suite, cette localisation chromatinienne a été confirmée par l'identification de l'interaction de Daxx avec de nombreuses protéines associées à l'ADN, comme ATRX (Xue et al. 2003). Grâce à son partenaire CENP-

C, une protéine impliquée dans la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, Daxx peut aussi se retrouver au niveau des centromères pendant l'interphase (Pluta et al. 1998). Une localisation nucléolaire a également pu être observée grâce à l'interaction que Daxx établit avec MSP58, une protéine localisée au niveau du nucléole et impliquée dans divers processus cellulaires dont la transcription (Lin et Shih 2002).

3. Les corps nucléaires PML

La majorité du Daxx nucléaire se retrouve en réalité au niveau de structures particulières, les corps nucléaires PML, capables de recruter et stocker un grand nombre de protéines localisées dans le noyau (Ishov et al. 1999; Torii et al. 1999). Daxx est en effet recruté au niveau de ces structures par l'intermédiaire de son domaine SIM, qui interagit avec la forme SUMOylée de PML (Ishov et al. 1999; Li et al. 2000) (Figure 19). En absence de PML, Daxx se retrouve associé à la chromatine condensée et donc inactive, et la réintroduction de PML par transfection transitoire restaure la localisation de Daxx au niveau des corps nucléaires, ce qui suggère que la simple interaction entre Daxx et PML induit le recrutement de Daxx au sein des CN PML (Ishov et al. 1999). La SUMOylation de PML est essentielle pour l'association de ces deux protéines puisque des mutants non SUMOylables de PML sont incapables de recruter Daxx. Ces structures nucléaires pourraient servir de lieu de stockage pour Daxx, permettant alors une régulation fine de ses diverses fonctions cellulaires.

C. Structure

Daxx est une protéine constituée de 740 acides aminés, et composée de différents domaines importants pour les interactions que Daxx établit avec ses différents partenaires.

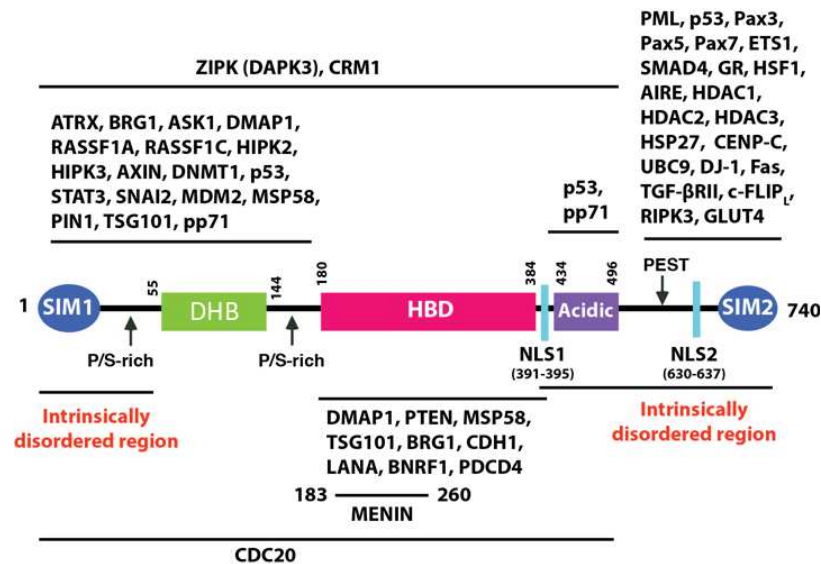


Figure 21 : Structure de la protéine Daxx et association avec ses différents partenaires

Schéma de la structure des différents domaines composant la protéine Daxx. Ses partenaires sont inscrits au niveau de leur site d'interaction avec Daxx. Les régions DHB et SIM2 constituent les principaux domaines d'interaction.

SIM : domaine d'interaction avec SUMO. DHB : Daxx helical bundle. HBD : domaine d'interaction aux histones. NLS : signal de localisation nucléaire. Acidic : région riche en acides aminés acides. (Mahmud et Liao 2019)

A partir de l'extrémité N-terminale, on retrouve un motif d'interaction avec SUMO (SIM1), suivi d'une région riche en hélices α (DHB), d'un domaine d'interaction avec les histones (HBD), d'une zone riche en résidus acides flanquée de 2 signaux de localisation nucléaire (NLS), et enfin un second SIM (SIM2) est retrouvé à l'extrémité C-terminale. En dehors de ces domaines caractérisés, Daxx est composé de régions intrinsèquement désordonnées, particulièrement au niveau de l'extrémité C-terminale (Figure 21).

1. Daxx helical bundle

Le DHB (Daxx helical bundle) est une région très conservée à travers les espèces, constituée d'un regroupement de 4 hélices α (Escobar-Cabrera et al. 2010). Il permet à Daxx d'interagir avec un certain nombre de ses partenaires comme Rassf1c ou ATRX (Z. Li et al. 2017; Wang et al. 2017) (Figure 21). L'interaction entre Daxx et ATRX est renforcée par des interactions électrostatiques qui s'établissent entre les résidus chargés positivement au niveau du DHB de Daxx et les résidus chargés négativement positionnés sur ATRX. L'environnement cellulaire sera déterminant pour la fixation de Daxx à l'un ou l'autre de ses cofacteurs.

2. Le domaine d'interactions aux histones

Le domaine d'interaction aux histones (Histone-binding site, HBD), ou domaine core, se trouve au centre de la protéine et est également très conservé à travers les espèces (Figure 21). Il s'agit d'une région composée de six hélices α qui se structurent autour de l'hétérodimère d'histones H3.3/H4, recouvrant jusqu'à 40% de sa surface (Elsässer et al. 2012). Il semblerait que Daxx, en collaboration avec ATRX, recrute les histones au sein des CN PML (Drané et al. 2010; Lewis et al. 2010). Ce processus empêche l'accumulation d'une forme soluble des histones H3.3-H4 et une incorporation non contrôlée de ces derniers (Delbarre et al. 2013). L'interaction de Daxx avec le dimère H3.3-H4 stabilise la région HBD, qui adopte sinon une structure plus désordonnée en solution (DeNizio, Elsässer, et Black 2014). Le HBD est suivi d'une région riche en résidus acides. Cette composition permettrait une meilleure affinité entre Daxx et le dimère d'histones H3.3-H4 (Drané et al. 2010).

3. Les motifs d'interaction avec SUMO

Deux domaines d'interaction avec SUMO (SIM) ont été identifiés à chaque extrémité de la protéine Daxx (Escobar-Cabrera et al. 2011; Lin et al. 2006) : ces régions sont responsables de l'interaction entre Daxx et ses partenaires SUMOylés (Figure 21). Ces deux régions sont composées d'un domaine hydrophobe flanqué de résidus acides ou susceptibles d'être phosphorylés. De ce fait, l'interaction SUMO-SIM s'établit par le biais de liaisons hydrophobes et électrostatiques entre Daxx et son partenaire SUMOylé. Il semblerait néanmoins que le SIM1 localisé à l'extrémité N-terminale ne soit pas fonctionnel, puisque des interactions intramoléculaires entre la région N-terminale intrinsèquement désordonnées et le DHB s'établissent et interfèrent avec la fixation du SIM1 à SUMO (Escobar-Cabrera et al. 2011). L'interaction entre la protéine SUMO et le SIM de Daxx peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation du SIM ou l'acétylation de SUMO. En effet, si certaines études menées *in vitro* ne montrent pas de préférence du SIM pour l'un des paralogues SUMO, d'autres travaux montrent que la phosphorylation du SIM régule la sélectivité pour l'un des paralogues SUMO. La région SIM2 située à l'extrémité C-terminale de Daxx et délimitée entre les acides aminés 732 et 740, contient des résidus sérine en position 737 et 739 susceptibles d'être phosphorylés par CK2 (Casein Kinase 2). Cette modification augmenterait l'affinité du SIM pour SUMO1 d'environ 30 fois par rapport à l'affinité observée pour SUMO2/3 (Chang et al. 2011). De plus, l'acétylation des résidus lysines K37, K39 ou K46 de SUMO1 réduit l'interaction entre SUMO1 et le domaine SIM de Daxx, ce qui engendre une modification de la localisation de Daxx en dehors des CN PML (Masclé et al. 2019). Ce domaine SIM étant impliqué dans l'interaction de Daxx

avec nombre de ses partenaires, il est particulièrement important à la fois pour sa localisation subcellulaire et ses fonctions biologiques (Lin et al. 2006). En outre, le SIM2 de Daxx est également important pour sa propre SUMOylation (Lin et al. 2006) et pour l'interaction entre Daxx et Ubc9, l'enzyme de conjugaison qui intervient dans le processus de SUMOylation.

4. Les modifications post-traductionnelles de Daxx

Daxx peut être associé à différentes modifications post-traductionnelles (MPT), comme la phosphorylation ou la SUMOylation, et ces modifications sont capitales pour que Daxx puisse assurer ses fonctions biologiques. Il existe plusieurs sites de phosphorylation, ciblés par différentes kinases, et même si la phosphorylation de Daxx peut avoir des conséquences diverses sur le devenir de la protéine, il semblerait qu'elle régule l'apoptose dépendante de Daxx. Les sérines positionnées en 176 et 184 sont ciblées par ASK1 (Kitamura et al. 2009), et leur phosphorylation engendre l'ubiquitination du résidu 122, puis l'apoptose (Fukuyo et al. 2009). A contrario, la phosphorylation de la sérine 178, qui induit également l'ubiquitination de Daxx, provoque sa dégradation protéasomale (Ryo et al. 2007). Le kinase HIPK1 phosphoryle quant à elle le résidu sérine en position 669 (Ecsedy et al. 2003). Par ailleurs, comme évoqué dans le paragraphe précédent, la phosphorylation de sérines contenues dans la région SIM2 module l'affinité de Daxx pour SUMO (Chang et al. 2011). En outre, Daxx contient plusieurs lysines susceptibles d'être SUMOylées et il est d'ailleurs nécessaire de muter 15 de ces lysines pour abolir sa SUMOylation (Jang, Ryu, et Kim 2002; Lin et al. 2006).

5. Les différentes isoformes de Daxx

Il existe deux isoformes de Daxx, générées par épissage alternatif, qui ont été décrites et caractérisées dans un article : les isoformes beta et gamma (Wethkamp et al. 2011). Ces deux formes ont la particularité d'être déléguées de leur domaine C-terminal, ce qui engendre une diminution de l'affinité de Daxx pour PML et p53, provoquant alors une modification de la localisation de Daxx et p53, ainsi qu'une inhibition de la répression transcriptionnelle modulée par p53.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Daxx est une protéine majoritairement nucléaire, et suivant les partenaires auxquels il s'associe, il est impliqué dans des processus cellulaires comme l'apoptose ou la répression transcriptionnelle. C'est par l'intermédiaire de cette dernière fonction que Daxx exerce un rôle antiviral en inhibant la réplication d'un grand nombre de virus à ADN, comme le cytomegalovirus (HCMV) (Woodhall et al. 2006), ou le virus Epstein-Barr (EBV) (Tsai et al. 2011). Dans le noyau, Daxx est associé à des structures particulières dont l'architecture dépend de la protéine PML, les corps nucléaires PML. Dans le cadre de travaux de recherche cherchant à élucider le mécanisme permettant à PML d'interférer avec une étape précoce du cycle de réplication du VIH-1, l'équipe a démontré que PML n'inhibait pas directement l'infection, mais stabilisait l'un de ses partenaires : Daxx. Ce dernier se trouve à proximité des capsides virales dans le cytoplasme des cellules infectées, et bloque une étape du cycle de réplication spécifique des rétrovirus, la transcription inverse. Cet article révèle ainsi une nouvelle fonction antivirale de Daxx.

L'objectif du travail présenté dans ce manuscrit est donc d'élucider le mécanisme par lequel Daxx parvient à inhiber la transcription inverse du VIH-1. Daxx étant une protéine chaperonne, il exerce ses différentes activités en s'associant à une multitude de partenaires. La majorité de ces interactions s'établissant par l'intermédiaire du domaine SIM de Daxx, l'implication de cette région dans l'activité antivirale de Daxx a été évaluée. Dans un second temps, différentes approches protéomiques et biochimiques ont été optimisées dans le but d'identifier les partenaires impliqués dans l'inhibition de la transcription inverse. L'identification de ces cofacteurs nous a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme par lequel Daxx exerce son activité restrictive contre le VIH-1.

Ce travail a récemment fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Viruses* (Maillet et al. 2020).

MATERIEL & METHODES

Plasmides

Les plasmides codant HA-Daxx WT, Δ SIM et 15KR ont été fournis par Hsiu-Ming Shih (Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan) (Lin et al. 2006). La protéine Daxx porte l'étiquette HA, qui correspond à l'hémagglutinine du virus Influenza. Le plasmide codant Flag-hTRIM5 α nous a été fourni par Stephen Goff (Columbia University, New York, USA) (Arriagada et al. 2011).

Les plasmides ont été amplifiés en bactéries chimiocompétentes, puis l'ADN plasmidique a été purifié grâce au kit Qiagen Plasmid Maxi kit, selon les instructions de fournisseur. Une fois resuspendus en tampon TE (10 mM Tris, 1mM EDTA), la pureté et la concentration des ADN plasmidiques obtenus ont été contrôlées par spectrophotométrie (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific).

Culture cellulaire

Les cellules HeLa (cellules de carcinome utérin) et HEK293T (cellules rénales embryonnaires) de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été cultivées à 37° et 5% de CO₂, en milieu Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies), supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Life Technologies) inactivé 30 minutes à 56°, et 1% de pénicilline (100U/mL) et streptomycine (100 μ g/mL) (Life Technologies).

Production et titration des vecteurs VIH-1 pseudotypés VSV-G et HA-Daxx

Des cellules HEK293T ont étéensemencées en flasque T175, puis transfectées au phosphate de calcium à raison de 15 μ g de plasmide VSV-G, codant la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), 30 μ g de plasmide p8.74 contenant les gènes *gag* et *pol* du VIH-1, et 30 μ g de plasmide pCSGW contenant la séquence codant la GFP (*Green fluorescent protein*), placée sous le contrôle d'un promoteur LTR et associée à un signal d'encapsulation (ou les plasmides pTRIP-HA-Daxx wt/ Δ SIM). Les surnageants contenant les vecteurs ont été récoltés 48h après la transfection, et concentrés par ultracentrifugation en DMEM 0%, milieu contenant les antibiotiques mais pas de SVF. Les productions virales ont ensuite été titrées soit en cellules, en mesurant l'expression de la GFP par cytométrie en flux, soit titrées par ELISA p24, à l'aide du kit Lenti-X p24 Rapid Titer (Ozyme) en suivant

les instructions données par le fournisseur. Dans ce cas, l'absorbance a été mesurée à 450 nm sur un colorimètre Sunrise (Tecan).

Pour la titration des vecteurs en cellules, 50 000 cellules HEK293T ont étéensemencées en plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été transduites par 5 µL de la production virale à tester, puis une dilution en cascade au 1/10 a été réalisée. Les cellules transduites ont été incubées 72h à 37° avant d'être fixées, et l'expression de la GFP a été mesurée par cytométrie en flux. Le titre final a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Titre} = \left(\frac{F \times Cn}{V} \right) \times DF$$

Le titre est exprimé en TU/mL (Titer Unit = nombre de vecteurs), F représente la fréquence du pourcentage de cellules exprimant de la GFP (mesuré au cytomètre), Cn désigne le nombre de cellules infectées, V symbolise le volume de vecteur utilisé pour la transduction des cellules, et DF correspond au facteur de dilution.

Transfection

Les cellules HeLa ont été transfectées au FuGENE6 (Promega) en suivant le protocole recommandé par le fournisseur. Les cellules HEK293T marquées par les différents isotopes pour l'expérience de SILAC ont été transfectées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou le Jet PEI (Polyplus), en suivant le protocole du fournisseur. Pour le reste des expériences, les cellules HEK293T ont été transfectées au phosphate de calcium. Pour les expériences menées en plaques 6 puits, un million de cellules sontensemencées (5 millions par boîte de Petri). Le lendemain, un mélange contenant 4 µg d'ADN au total (ou 20 µg pour une boîte de Pétri) mélangé au phosphate de calcium a été répartis goutte à goutte sur les cellules. Les cellules ont été récoltées après 24 (pour Daxx) ou 48h (pour les autres plasmides comme TRIM5α) de transfection.

Transduction des cellules

Les cellules ont été transduites en DMEM 0%, en présence de 7 µg/mL de DEAE-Dextran (Sigma), à une MOI de 1 pour les expériences de restriction, ou de 10 pour les expériences de d'immunoprécipitation ou de *fate of capsid assay*. Après 4 ou 6h de transduction, les cellules ont été récoltées. Le Debio-025 (Debiopharm), un inhibiteur de l'interaction entre cyclophiline A et capsid, a été utilisé à 200 nM et les cellules ont été traitées 2h avant la transduction par les vecteurs VIH-1 pseudotypé VSV-G. La

névirapine (Merck), un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, a été utilisée à 5 μ M au moment de la transduction.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour contrôler les niveaux de transfection et de transduction dans différentes expériences. Au moment de la collecte, les cellules destinées à être analysées par cytométrie ont été fixées en PFA2% (Paraformaldehyde). Après un lavage en PBS-BSA1%, elles ont été perméabilisées et saturées en PBS-BSA1%-Saponine0,05% pendant 15 minutes. Elles ont ensuite été incubées dans l'anticorps primaire pendant 40 minutes, lavées en PBS-BSA1%-Saponine0,05%, puis incubées dans l'anticorps secondaire 30 minutes à 4°. Après un dernier lavage en PBS-BSA1%, les cellules ont été resuspendues et conservées à 4° en PFA 2% en attendant leur passage au cytomètre. Les données ont été acquises sur un cytomètre FACSCalibur (BD), puis analysées à l'aide du logiciel FlowJo (BD). L'étiquette HA a été marquée par un anticorps anti-HA produit chez le rat, clone 3H10 (Merck). L'anticorps secondaire anti-rat utilisé est un anticorps de chèvre couplé au fluorochrome Alexa Fluor 647 (Life Technologies). La protéine Gag a été détectée par un anticorps dirigé contre la polyprotéine Gag du VIH-1, clone KC57, couplé au fluorochrome FITC (Coulter Clone).

Fractionnement subcellulaire

A partir d'une boîte de Pétri confluente, le fractionnement subcellulaire a été réalisé, soit en suivant un protocole utilisé dans le laboratoire, soit à l'aide d'un kit commercial, le kit d'extraction cytoplasmique et nucléaire NE-PER™ (ThermoFisher Scientific), en suivant le protocole conseillé par le fournisseur.

En ce qui concerne le protocole mis en place dans le laboratoire, les cellules ont été collectées puis lavées au PBS. Lors de ce premier lavage, un dixième des cellules a été conservé puis lysé pour constituer les extraits totaux. Le reste des cellules a été lysé dans 100 μ L d'un tampon composé de 10 mM Tris pH 7,6, 1,5 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 10mM iodoacétamide et 1 tablette d'inhibiteurs de protéases, le tout dilué en PBS 1X. Après une heure d'incubation sur glace et sous agitation douce, les extraits ont été centrifugés 15 minutes à 500 g à 4°, les cytoplastes ont été prélevés, et 100 μ L de Laemmli 2X ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20° jusqu'à leur dépôt.

Immunoprécipitations

Toutes les immunoprécipitations ont été réalisées à partir de cellules en boîte de Pétri de 10 cm de diamètre confluentes. Les cellules ont été récoltées, lavées au PBS, puis lysées dans 500 μ L de tampon de lyse (50 mM Tris pH7,4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1% Triton ; 1 tablette d'inhibiteurs de protéases ; 10 mM iodoacétamide), pendant 30 minutes sur la glace, en vortexant toutes les 10 minutes. Après 10 minutes de centrifugation à 4° et à 12 000 g, 50 μ L de lysat ont été prélevés pour constituer les extraits totaux, auxquels ont été ajoutés 50 μ L de Laemmli 2X. Pour l'immunoprécipitation de l'étiquette HA, 50 μ L de billes d'agarose associées à un anticorps HA-7 (Sigma) ont été lavées en tampon de lyse à trois reprises. Une fois les lavages terminés, les billes ont été resuspendues dans les 450 μ L de lysat cellulaire restant, puis incubées sur roue à 4° jusqu'au lendemain. Les billes ont une nouvelle fois été lavées en tampon de lyse, à trois reprises pendant 15 minutes sur roue, afin de limiter la fixation non spécifique de protéines sur les billes d'agarose. Enfin, les protéines ont été éluées dans 60 μ L de Laemmli 2X, en chauffant les échantillons 3 min à 95°. Dans le cas des immunoprécipitations de la forme endogène de Daxx, 5 μ g d'anticorps Daxx 7A11 (Abnova) ont été ajoutés aux 450 μ L de lysat cellulaire. Après une incubation de 16h à 4°, les lysats ont été mis en contact avec des billes de protéineG-Sépharose (ThermoFisher Scientific), préalablement lavées trois fois en tampon de lyse. Après une nouvelle incubation d'une nuit à 4° sur roue, les billes ont été lavées à l'aide du tampon de lyse, puis les protéines ont été éluées comme précédemment, par l'ajout de 60 μ L de Laemmli 2x et chauffage des extraits pendant 3 min à 95°.

Western-Blot

Le laboratoire utilise le système de migration et de transfert SureCast, développé par ThermoFisher Scientific. Les cellules ont été lysées en suivant le protocole détaillé dans le paragraphe précédent. Avant d'être déposés, les échantillons ont systématiquement été chauffés 10 minutes à 95°, puis centrifugés 5 minutes à 12 000 g. La migration s'effectue en conditions dénaturantes, dans des gels d'acrylamide 8 ou 10% immergés dans le tampon MOPS (ThermoFischer Scientific), à voltage constant. Les protéines contenues dans le gel ont ensuite été transférées en milieu liquide (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Ethanol) sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare), à courant constant (350 mA) pendant 1 heure. Le transfert des protéines a été contrôlé par le marquage de la membrane de nitrocellulose au rouge Ponceau. La membrane a ensuite été saturée au moins 30 minutes en tampon de saturation (PBS 1X, Tween 0,05%, lait 5%). Les protéines d'intérêt ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique, puis d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Horseradish

peroxydase), mis en solution dans le tampon de saturation. Les membranes ont été incubées au moins une heure dans les anticorps, à température ambiante ou à 4°. Le signal luminescent émis suite à l'ajout de l'ECL (BioRad) a été détecté au Chemidoc™ XRS + (BioRad), et les images ont été traitées à l'aide du logiciel associé au Chemidoc, ImageLab™ (BioRad). La forme endogène de la protéine Daxx a été détectée par l'anticorps Daxx 7A11 (Abnova). Les autres anticorps utilisés dans ces travaux sont les suivants : anticorps de souris dirigés contre la β -actine et l'étiquette Flag, clone M2 (Merck), anticorps de souris anti-p24 du VIH-1 (NIH AIDS reagent program, clone 183), anticorps de souris anti-TNPO1 (Abcam), anticorps de lapin anti-CypA (Santa Cruz), anticorps de souris anti-HA-7 (Merck). L'anticorps de lapin anti-TRIM5 α vient du laboratoire de P. Bieniasz. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps de chèvre anti-souris ou anti-lapin, couplés à la peroxydase HRP (GE Healthcare).

Quantification des rétro-transcrits par PCR quantitative

Les expériences ont été réalisées en plaques 6-puits. Les cellules transfectées 24h pour surexprimer les différentes formes de Daxx ont été transduites à l'aide d'un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G pré-traité avec 250 U/mL de benzonase (Merck) pendant 20 min à 37°. Après transduction, les ADN totaux ont été extraits à l'aide du kit DNeasy Blood and tissue (Qiagen), en suivant le protocole du fournisseur. La pureté et la concentration des ADN totaux obtenus ont été contrôlées par spectrophotométrie (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific). Le mélange Takyon ROX SYBR MasterMix Blue dTTP (Eurogentec) a été utilisé pour les réactions de PCR en temps réel, réalisées en duplica sur le système Applied Biosystems QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), en suivant le protocole suivant : une première étape de 3 min à 95°, suivie de 35 cycles de 15 s à 95°, 20 s à 60°, puis 20 s à 72°. Une dernière étape a été ajoutée à la suite des 35 cycles pour obtenir une courbe de fusion : 15 s à 95°, 1 min à 60° et 1 s à 95°. La quantité de chaque transcrit a été normalisée par rapport aux niveaux des transcrits de la GAPDH. Les produits de la transcription inverse précoce ont été amplifiés par le couple d'amorce M667/AA55M, spécifiques de l'ADN strong stop, tandis que les transcrits tardifs ont été détecté grâce au couple d'amorce M667/M661, qui amplifient la région RU5-PBS de la région 5' non codante. Le tableau suivant récapitule la séquence de chacune des amorces utilisées :

Amorce	Séquence
GAPDH-F	5' ACTTCAACAGCGACACCCACT 3'
GAPDH-R	5' GTGGTCCAGGGGTCTTACTCC 3'
M667	5' GGCTAACTAGGGAACCCACTG 3'
AA55M	5' GCTAGAGATTTCCACACTGACTAA 3'
M661	5' CCTGCGTCGAGAGAGCTCCTCTGG 3'

Spectrométrie de masse *label free*

Trois conditions ont été envoyées à la plateforme de spectrométrie de masse. Des cellules HEK293T ont été transfectées soit par un plasmide vide (EV), soit par un plasmide surexprimant la forme sauvage (WT) ou la forme mutante Δ SIM (Δ SIM) de HA-Daxx. Après 24h de transfection, les cellules ont été transduites ou non par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G pendant 4 heures. L'étiquette HA a été immunoprécipitée à l'aide de billes couplées à l'anticorps HA-7, en suivant le protocole détaillé dans le paragraphe « immunoprécipitation ». Après avoir contrôlé les niveaux de transfection et de transduction des cellules, les trois échantillons transduits ont été déposés à la plateforme de spectrométrie de masse pour analyse.

Aux vues de la quantité de protéines présentes dans les différentes conditions, chaque échantillon a été fractionné en 3 bandes. Les 9 échantillons peptidiques obtenus suite au découpage (3 ech x 3 bandes) ont été repris dans 10 μ L de tampon A (0.1% acide formique). 1 μ L/échantillon a été injecté pour une analyse en ligne en utilisant une HPLC nano débit (RLSC U3000, Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été séparés sur une colonne capillaire (0.075 mm x 150 mm, Acclaim Pepmap 100, phase inverse C18, NanoViper, Thermo Fisher Scientific) suivant un gradient de 2-40% de tampon B en 120 min (A= 0.1% acide formique, B = 0.1% acide formique, 80% acetonitrile) à un débit de 300 nL/min. Les spectres ont été enregistrés via le logiciel Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher Scientific) avec la méthode FAST1_120min.meth. Ces appareils sont contrôlés régulièrement (nettoyage, fluides, calibration). Les données spectrales ont été analysées via les logiciels MaxQuant v1.5.5.1 et Perseus v1.6.2.1, avec utilisation du script Leading FPP v3.2. Nous avons utilisé les bases de données RefProteome_HUMAN-cano_2018_04 et RefProteome_HIV-1_11676_cano_2018_07. La validation des données a été réalisée avec les filtres suivants : FDR peptidique et protéique 0.01. L'ensemble du processus a été vérifié par Mathilde Decourcelle (Plateforme de Protéomique Fonctionnelle de l'Université de Montpellier).

SILAC

Puisque ce type d'expérience permet une analyse quantitative des données, le choix des isotopes à ajouter au milieu de culture est essentiel pour avoir un taux d'incorporation optimal. Les acides aminés choisis doivent être essentiels à la synthèse des protéines, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas naturellement produits par la cellule, et présents dans la plupart des peptides. L'incorporation de ces résidus isotopiquement marqués ne doit pas modifier les propriétés physico-chimiques des protéines. En

choisissant la lysine et l'arginine, on s'assure que chaque peptide issu de la digestion trypsique contient un isotope marqué, la trypsine coupant systématiquement les peptides après un résidu lysine ou arginine. Il est également important que l'acide aminé choisi ne soit pas métabolisé par la cellule, afin de limiter les erreurs de quantification qui en découleraient. C'est par exemple ce qui se produit lors de la conversion de l'arginine en proline : lorsque l'arginine est présente en large excès dans le milieu de culture, la cellule risque de la convertir en proline afin de rétablir un équilibre perturbé dans le milieu de culture. Pour pallier ce phénomène, l'une des solutions est de compléter le milieu de culture avec de la proline non marquée, en plus de l'ajout des différents isotopes.

Des cellules HEK293T ont été cultivées deux semaines en milieu DMEM pour SILAC, dépourvu de L-lysine et L-arginine, supplémenté de 1% d'antibiotiques penicilline-streptomycine, 10% de sérum de veau fœtal dialysé et inactivé 30 min à 56°, et 200 µg/mL de L-proline (tous les produits ont été achetés chez ThermoFisher Scientific). Ce milieu de culture a ensuite été supplémenté de 84 µg/mL de L-arginine et 146 µg/mL de L-lysine (ThermoFisher Scientific) pour le milieu de culture léger. Les milieux moyens et lourds contiennent quant à eux les mêmes proportions de $^{13}\text{C}_6$ -L-arginine et $^2\text{H}_4$ -L-lysine, ou de $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$ -L-arginine et de $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ -L-lysine respectivement (Cambridge Isotope Laboratories, gracieusement fournis par Guillaume Bossis, IGMM). Le taux d'incorporation des isotopes (97%) et le taux de conversion de la proline (2% pour la condition moyenne, et 4% pour la condition lourde) ont été mesurés après deux semaines de culture dans les différents milieux par la plateforme de spectrométrie de masse de Montpellier.

Pour le crible SILAC, 5 millions de ces cellules HEK293T en culture ont étéensemencées en boîte de Petri, puis transfectées à la Lipofectamine2000 (Invitrogen) par 10 µg de plasmide. Les cellules marquées par les isotopes légers ont été transfectées par un plasmide vide, tandis que les cellules marquées par les isotopes moyens et lourds ont été transfectées par les formes sauvages ou mutantes du plasmide codant HA-Daxx respectivement. Après 24h de transfection, les cellules ont été transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G, et 4h plus tard, l'étiquette HA a été immunoprécipitée dans les trois conditions. Les extraits ont ensuite été déposés à la plateforme de spectrométrie de masse de Montpellier.

Les trois conditions ont été rassemblées en un seul échantillon : 40 µL ont été déposés et fractionnés en 3 bandes. Les échantillons peptidiques ont été repris dans 10 µL de tampon A (0.1% acide formique). 2 µL/échantillon ont été injectés pour une analyse en ligne en utilisant une HPLC nano débit (RLSC U3000, Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse équipé d'une source nanoelectrospray (Q Exactive HF, Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été séparés sur une

colonne capillaire (0.075 mm x 500 mm, Acclaim Pepmap 100, phase inverse C18, NanoViper, Thermo Fisher Scientific) suivant un gradient de 2-40% de tampon B en 1280 min (A= 0.1% acide formique, B = 0.1% acide formique, 80% acetonitrile) à un débit de 300 nL/min. Les spectres ont été enregistrés via le logiciel Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher Scientific) avec la méthode 128min.meth. Ces appareils sont contrôlés régulièrement (nettoyage, fluides, calibration). Les données spectrales ont été analysées via les logiciels Proteome Discoverer 2.4 et Perseus v1.6.10.43, avec utilisation du script Master_Leading_v3.2ML1. Nous avons utilisé comme bases de données : RefProteome_HUMAN-cano_2019_11. La validation des données a été réalisée avec les filtres suivants : FDR protéique à 0,01 (High confidence) / 0,05 (Medium confidence). L'ensemble du processus a été vérifié par Mathilde Decourcelle.

Etude du devenir de la capsid : *Fate of capsid assay*

La technique du *fate of capsid assay* a pour but d'étudier la stabilité de la capsid en séparant les cores stables des monomères de capsid solubles par ultracentrifugation. Le protocole est détaillé dans l'article publié par Yang, Luban et Diaz-Griffero (Yang, Luban, et Diaz-Griffero 2014).

Des cellules HEK293T ont étéensemencées, à raison de 5 millions de cellules par boîte de Petri de 10 cm de diamètre, puis transfectées le lendemain au phosphate de calcium par 20 µg de plasmide vide, ou codant les formes sauvages ou mutantes ΔSIM de Daxx. Après 24h de transfection, les cellules ont été transduites 4h par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G, en présence de 7µg/mL de DEAE-Dextran. Les cellules ont ensuite été lysées dans 1 mL d'un tampon de lyse hypotonique (10 mM Tris pH 8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM iodoacétamide, 1 tablette d'inhibiteurs de protéases), puis incubées à 4° pendant 16h. Le lendemain, la lyse a été finalisée à l'aide d'un *dounce homogenizer*, et les extraits ont été centrifugés à 1000 g pendant 4 minutes à 4° afin d'éliminer les débris cellulaires. Pour constituer les extraits totaux, 100 µL ont été prélevés et conservés. Le reste des échantillons a été déposé sur un coussin de sucrose 50%, puis centrifugé à 100 000 g pendant 2 heures à 4°. La fraction de capsid soluble a été récupérée en prélevant 100 µL à la surface du coussin de sucrose. Après avoir éliminé le reste de sucrose, les cores stables ont été resuspendus dans 100 µL de PBS. Les trois fractions ont ensuite été analysées par western-blot

Immunofluorescence

Les cellules HEK293T ont été cultivées et transfectées directement sur lamelle de microscopie, en suivant le protocole décrit précédemment. Ce type cellulaire n'adhérant que modérément, les lamelles ont préalablement été traitées à la poly-D-lysine 2h à 37° (Merck). Après 24h de transfection, les cellules ont été fixées 10 min en PFA4%, lavées au PBS, incubées 10 min dans 50 mM de NH₄Cl, perméabilisées 15 min en Triton 0,5%, puis saturées 10 min dans 0,3% de PBS-BSA. Les cellules ont ensuite été incubées dans un anticorps primaires reconnaissant l'étiquette HA, 1h en chambre noire humide. Après un lavage en PBS, les lamelles ont été incubées dans l'anticorps secondaire pendant 30 min en chambre noire humide. Les cellules ont été lavées en PBS, les noyaux ont été marqués au Hoechst pendant 3 min, et les lamelles ont été montées à l'aide du milieu de montage slowfade (ThermoFisher Scientific). Les images ont été acquises sur un microscope confocal SP5-SMD (Leica), puis traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

RESULTATS

Une partie des résultats faisant l'objet d'une publication, celle-ci est intégrée au manuscrit en première partie de ce chapitre (Maillet et al. 2020). Les expériences d'optimisation et les résultats complémentaires obtenus au cours de ma thèse sont présentés dans la suite du chapitre.

I. Inhibition SUMO-dépendante de la transcription inverse et de la décapsidation du VIH-1 par Daxx



Article

Daxx Inhibits HIV-1 Reverse Transcription and Uncoating in a SUMO-Dependent Manner

Sarah Maillet ¹, Juliette Fernandez ¹, Mathilde Decourcelle ², Khadija El Koulali ², Fabien P. Blanchet ¹, Nathalie J. Arhel ¹, Ghizlane Maarifi ¹ and Sébastien Nisole ^{1,*}

Daxx est une protéine chaperonne très conservée à travers les espèces, exprimée de manière ubiquitaire, et impliquée dans divers processus cellulaires comme l'apoptose ou la répression transcriptionnelle. Au cours de travaux précédents, il a été montré que Daxx pouvait interférer avec la réplication du VIH-1 en bloquant l'étape essentielle de transcription inverse. Le but de cette étude était donc d'élucider le mécanisme par lequel Daxx parvenait à exercer cette activité antivirale, en identifiant notamment les partenaires cellulaires ciblés par Daxx pour assurer cette fonction inhibitrice. Nous avons tout d'abord montré que la région SIM de Daxx, localisée à l'extrémité C-terminale de la protéine, était nécessaire à l'inhibition de la rétrotranscription. En combinant ensuite une analyse protéomique à des analyses biochimiques plus classiques, nous avons montré que Daxx s'associe aux capsides virales entrantes par l'intermédiaire d'une interaction avec CypA, interaction qui dépend du SIM de Daxx. Daxx se trouve en réalité au sein d'un complexe multiprotéique contenant également les protéines TNPO3, TRIM5 α , et TRIM34. Compte tenu du rôle de certains de ces facteurs dans la stabilité des cores viraux, nous avons également montré que Daxx stabilise les capsides du VIH-1 de manière SIM-dépendante. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le complexe multiprotéique contenant Daxx stabilise les capsides virales entrantes, empêchant ainsi la décapsidation et la transcription inverse. Il s'agit d'une nouvelle fonction associée à Daxx, qui illustre une fois encore le lien étroit qui existe entre les étapes de décapsidation et de transcription inverse.

Article

Daxx Inhibits HIV-1 Reverse Transcription and Uncoating in a SUMO-Dependent Manner

Sarah Maillet ¹, Juliette Fernandez ¹, Mathilde Decourcelle ², Khadija El Koulali ²,
Fabien P. Blanchet ¹, Nathalie J. Arhel ¹, Ghizlane Maarifi ¹ and Sébastien Nisole ^{1,*}

¹ Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, CNRS, 34090 Montpellier, France; sarah.maillet@irim.cnrs.fr (S.M.); juliette.fernandez@irim.cnrs.fr (J.F.); fabien.blanchet@irim.cnrs.fr (F.P.B.); nathalie.arhel@irim.cnrs.fr (N.J.A.); ghizlane.maarifi@irim.cnrs.fr (G.M.)

² BCM, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, 34090 Montpellier, France; Mathilde.Decourcelle@fpp.cnrs.fr (M.D.); khadija.el-koulali@fpp.cnrs.fr (K.E.K.)

* Correspondence: sebastien.nisole@inserm.fr

Received: 21 May 2020; Accepted: 9 June 2020; Published: 11 June 2020



Abstract: Death domain-associated protein 6 (Daxx) is a multifunctional, ubiquitously expressed and highly conserved chaperone protein involved in numerous cellular processes, including apoptosis, transcriptional repression, and carcinogenesis. In 2015, we identified Daxx as an antiretroviral factor that interfered with HIV-1 replication by inhibiting the reverse transcription step. In the present study, we sought to unravel the molecular mechanism of Daxx-mediated restriction and, in particular, to identify the protein(s) that Daxx targets in order to achieve its antiviral activity. First, we show that the SUMO-interacting motif (SIM) located at the C-terminus of the protein is strictly required for Daxx to inhibit HIV-1 reverse transcription. By performing a quantitative proteomic screen combined with classical biochemical analyses, we found that Daxx associated with incoming HIV-1 cores through a SIM-dependent interaction with cyclophilin A (CypA) and capsid (CA). Daxx was found to reside within a multiprotein complex associated with viral capsids, also containing TNPO3, TRIM5 α , and TRIM34. Given the well-known influence of these cellular factors on the stability of HIV-1 cores, we investigated the effect of Daxx on the cytoplasmic fate of incoming cores and found that Daxx prevented HIV-1 uncoating in a SIM-dependent manner. Altogether, our findings suggest that, by recruiting TNPO3, TRIM5 α , and TRIM34 and possibly other proteins onto incoming HIV-1 cores through a SIM-dependent interaction with CA-bound CypA, Daxx increases their stability, thus preventing uncoating and reverse transcription. Our study uncovers a previously unknown function of Daxx in the early steps of HIV-1 infection and further illustrates how reverse transcription and uncoating are two tightly interdependent processes.

Keywords: Daxx; HIV-1; reverse transcription; uncoating; restriction factor; interferon; ISG; intrinsic immunity; host defense

1. Introduction

HIV-1, like all viruses, is an obligate parasite and requires numerous cellular factors and pathways to replicate. As a result, mammalian cells have developed specific factors that function in a cell-autonomous manner to limit virus replication. These have been termed restriction factors and constitute the so-called intrinsic immunity, which is now considered to be the third arm of immunity [1]. Most restriction factors, however, even if they are constitutively expressed, are upregulated by type I interferon(s), and thus intrinsic defenses can be considered to be a part of antiviral innate immunity [2,3]. Since the discovery of the first HIV-1 restriction factor, in 2002, APOBEC3G [4], many other factors have been identified and shown to inhibit nearly all steps of the HIV-1 replicative cycle (reviewed

in [5–7]). However, reverse transcription appears to be a hotspot for restriction, since it is targeted by several potent antiviral factors, including TRIM5 α [8], APOBEC3G [4,9], and SAMHD1 [10,11]. Reverse transcription of HIV-1 genomic RNA occurs within incoming cores that are released in the cytosol following viral entry and undergo morphological changes including disassembly, which is referred to as uncoating (reviewed in [12,13]). Although the mechanisms underlying the spatial and temporal regulation of reverse transcription and uncoating are still under debate, evidence is emerging that they are tightly linked and coordinated. Indeed, while TRIM5 α has been shown to inhibit reverse transcription through a premature disassembly of viral cores [14], inhibition of reverse transcription delayed uncoating [15–17], and reverse transcription itself was shown to initiate capsid disassembly [18,19]. A proper coordination of reverse transcription and uncoating is essential to ensure a productive infection. The coordination of this chain of events that ultimately leads to nuclear import and integration involves several viral and cellular proteins (reviewed in [12,20,21]). Among the numerous cellular factors that interact with HIV-1 cores and control their stability are cyclophilin A (CypA) [22], TNPO1 [23], TNPO3 [24,25], Nup153 [26], TRIM34 [27,28], Pin1 [29], and CPSF6 [30] (reviewed in [31]). CypA binds to the so-called CypA-binding loop in the N-terminal domain of the capsid (CA) protein and is incorporated inside viral particles [32,33]. Despite intensive research, however, its exact role in the early steps of HIV-1 infection has remained elusive. Disruption of CypA–CA interactions by either treatment with cyclosporine or its analogues (e.g., Debio 025) or by mutation within CA (e.g., G89V or P90A) decreased HIV-1 infection, by affecting uncoating or reverse transcription in certain cell types [34–37]. CypA has also been recently found to protect HIV-1 from TRIM5 α -mediated restriction in human primary cells [38,39].

In 2015, we identified the death domain-associated protein 6 (Daxx) as a new antiviral factor interfering with HIV-1 replication and showed that reverse transcription was the step being affected [40]. Although we showed that restriction occurred at the step of reverse transcription, the mechanism involved was unclear. Daxx is a multifunctional, ubiquitously expressed and highly conserved protein through evolution. It has no enzymatic activity, but rather acts as a scaffold to bridge different proteins, thus regulating their function (reviewed in [41–43]). Although this multifunctional adapter is present in the cytoplasm, it is mainly expressed in the nucleus, where it localizes within promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear bodies. The recruitment of Daxx within PML nuclear bodies is mediated by its direct interaction with SUMOylated PML through the SUMO-interacting motif (SIM) located at its C-terminal end [44,45]. Although it is itself SUMOylated, most of Daxx functions are mediated by its SIM, which binds and recruits SUMO-conjugated proteins. Daxx has been implicated in several biological processes, but its implication in apoptosis and transcriptional repression have been particularly well characterized (reviewed in [41–43]). It is interesting to note that Daxx has been shown to restrict several viruses, mostly DNA viruses, but also retroviruses, through its capacity to repress transcription [42,46–49].

In the present study, we investigated how Daxx inhibits HIV-1 reverse transcription. First, we determined that Daxx expression is upregulated by interferon (IFN) in both murine and human cells. Furthermore, we showed that Daxx is a mediator of the type I IFN-induced inhibition of HIV-1 reverse transcription. Next, by using Daxx mutants, we established that the SIM domain was required for the Daxx-mediated inhibition of reverse transcription, thus suggesting that Daxx's target, be it viral or cellular, was SUMOylated. In order to identify this target, we performed a proteomic screen of cellular proteins interacting with Daxx, using stable-isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This screen identified several previously-identified HIV-1 core-binding proteins, including CypA. Further biochemical analyses revealed that Daxx binds to incoming HIV-1 cores through a SIM-dependent interaction with CypA. Furthermore, we found that Daxx recruits several proteins onto viral capsids, including TNPO3, TRIM5 α , and TRIM34, which is concordant with its role as a scaffolding protein. Finally, we performed fate-of-capsid assays to demonstrate that Daxx inhibits the uncoating of incoming HIV-1 cores. Altogether, our results suggest that, by binding to CypA through its SIM domain, Daxx

forms a multiprotein complex around HIV-1 cores that prevents uncoating, and therefore inhibits reverse transcription.

2. Materials and Methods

2.1. Plasmids

Plasmids constructs expressing HA-tagged Daxx wild-type (wt), and 1-732 and 15KR Daxx mutants were kindly provided by Hsiu-Ming Shih (Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan) [44]. The plasmid expressing Flag-tagged human TRIM5 α was provided by Stephen P. Goff (Columbia University, New York, NY, USA) [50].

2.2. Cell Culture and Transfections

HeLa cells, HEK293T, and MDTF cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM containing 10% FCS, supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Transient plasmid transfections were performed using either Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) for HEK293T cells, or FuGENE 6 (Promega, Madison, WI, USA) for HeLa cells, following the manufacturer's instructions. Daxx-specific and untargeting (CTR) siRNA were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA) as pools of 4 individual siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool). Transfections of siRNA were performed using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

2.3. Viruses and Vectors

Defective-interfering H4 Sendai virus (SeV) was provided by Dominique Garcin (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland) and was used at 50 HAU/mL [51]. HIV-1 vectors encoding GFP were produced by transient cotransfection of HEK293T cells using calcium-phosphate precipitation with a GFP-expressing HIV-1 vector (pCSGW), an encapsidation plasmid (p8.91 for HIV-1 wt, or the corresponding capsid mutant P90A), and a VSV-G envelope expression plasmid (pVSVG). The vectors were harvested after 2 days, filtered and ultracentrifuged at 22,000 rpm for 1 h, at 4 °C (SW32Ti rotor), and titred by flow cytometry measuring the GFP expression.

2.4. Antibodies and Reagents

For the detection of Daxx in human cells by Western blot and immunofluorescence, we used a Daxx monoclonal antibody (clone 7A11) purchased from Abnova (Taipei City, Taiwan). For detecting murine Daxx by Western blot, the monoclonal anti-Daxx antibody (clone H-7) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) (sc-8043) was used. Other primary antibodies used in Western blot and immunoprecipitation experiments were the following: mouse monoclonals against β -actin and FLAG (from Merck KGaA, Darmstadt, Germany), mouse anti-p24 (NIH AIDS Reagent program clone 183-H12-5C), mouse anti-TNPO1 (Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit anti-cyclophilin A (Santa Cruz Biotechnology, sc-20360-R) and mouse anti-HA (Merck), rabbit anti-STAT1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-345), mouse anti-TNPO3 (Abcam), rabbit anti-RanBP2 (Thermo Fisher Scientific, PA1-O82), rabbit anti-TRIM34 (RNF21/IFP1, Abcam), and rabbit anti-TRIM5 α (gift from P. Bieniasz, The Rockefeller University, New York, NY, USA) [52]. Secondary antibodies were goat anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase conjugates (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and goat anti-mouse AF555 (Thermo Fisher Scientific).

Debio 025 was purchased from Debiopharm (Lausanne, Switzerland) and was used at 200 nM 2 h before HIV-1 transduction. Nevirapine (Merck) was used at 5 μ M. IFN- α 2, IFN- β , and IFN- γ were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and were used on human cell lines at 1000 UI/mL. For murine cells (IFN), Universal type I IFN (R&D Systems) was used at 200 UI/mL.

2.5. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)

HEK293T cells were cultured for two weeks in SILAC DMEM lacking L-lysine and L-arginine and supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 10% heat-inactivated dialyzed FBS, and 200 µg/mL L-proline (all purchased from Thermo Fisher Scientific). The medium was supplemented with 84 µg/mL L-arginine and 146 µg/mL L-lysine (both from Thermo Fisher Scientific) for the light medium (K0 R0), while the same amounts of $^{13}\text{C}_6$ -L-arginine and $^2\text{H}_4$ -L-lysine, or $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$ -L-arginine and $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ -L-lysine (from Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA, kindly provided by Guillaume Bossis, IGMM, Montpellier, France) were added to the medium and heavy media, respectively. After complete labeling monitored by MS analysis, 5×10^6 cells from each condition were seeded in 10 cm Petri dishes. Light-labeled cells were transfected with an empty plasmid, whereas medium- and heavy-labeled cells were transfected with plasmids expressing Daxx wt or 1-732 (Δ SIM) mutant, respectively. Cells were transduced 24 h post transfection with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 10. After 4 h, cell extracts were prepared and Daxx was immunoprecipitated using anti-HA antibodies.

2.6. Mass Spectrometry

Equal amounts of the three immunoprecipitation elutions (light, medium, and heavy) were mixed at a ratio 1:1:1. After denaturation at 95 °C during 5 min, proteins were separated by SDS-PAGE and stained with a protein staining solution (PageBlue, Thermo Fisher Scientific). Proteins were fractionated in three bands. Pieces of gel were excised and destained with three washes in 50% acetonitrile (ACN) and 50 mM triethylammonium (TEABC). After protein reduction (10 mM dithiothreitol in 100 mM TEABC at 60 °C for 30 min) and alkylation (55 mM iodoacetamide in TEABC at room temperature for 30 min in the dark), proteins were digested in-gel using Trypsin overnight (1 µg, Gold, Promega) as previously described [53]. Digest products were dehydrated in a vacuum.

The resulting peptide samples were resuspended in 10 µL of loading buffer (0.05% TFA and 2% ACN) and 2 µL were loaded onto an analytical 50 cm reversed-phase column (75 mm inner diameter, Acclaim Pepmap 100[®] C18, Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated with an Ultimate 3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to a Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) via a nano-electrospray source, using a 123 min gradient of 2 to 40% of buffer B (80% ACN, 0.1% formic acid) and a flow rate of 300 nL/min. MS/MS analyses were performed in a data-dependent mode. Full scans (375–1500 m/z) were acquired on the Orbitrap mass analyzer with a 60,000 resolution at 200 m/z. For the full scans, 3×10^6 ions were accumulated within a maximum injection time of 60 ms and detected in the Orbitrap analyzer. The twelve most intense ions with charge states ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 1×10^5 with a maximum injection time of 45 ms and fragmented by HCD (higher-energy collisional dissociation) in the collision cell (normalized collision energy of 28%) and detected in the Orbitrap analyzer at 30,000 resolution.

MS/MS data analysis was performed using Proteome Discoverer software (v2.4.0.305, Thermo Fisher Scientific). All MS/MS spectra were searched using the SequestHT search engine against the UniProtKB Reference proteome UP000005640 database for Homo sapiens (release 2019_11, <https://www.uniprot.org/>), sequences of mutant Daxx protein and viral proteins, and a homemade contaminant database. Carbamidomethylation was set as fixed cysteine modification. Dynamic modifications were defined as methionine oxidation, N-terminal acetylation, methionine loss, and SILAC 3plex labeling (Arg0 Lys0/Arg6 Lys4/Arg10 Lys8). False discovery rate (FDR) for proteins was set to 1% for high confidence and 5% for medium confidence identification. A representative protein ID in each protein group (Protein Group IDs column) was automatically selected using an in-house bioinformatics tool (Master-Leading v3.2ML1) as the best annotated protein in UniProtKB (reviewed entries rather than automatic ones). Graphical representation and analysis of quantification data were performed using Perseus (v1.6.10.43) [54]. Abundance ratio based on median peptides ratios was used to highlight proteins differentially expressed between conditions. An outlier significance score for log abundance ratios was calculated (Significance A) and a FDR was calculated using a two-sided test (Benjamini–Hochberg FDR) [55].

2.7. Immunoprecipitations

Cells were lysed in immunoprecipitation (IP) lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Merck), and 10 mM iodoacetamide (Merck). Cell lysates were incubated overnight at 4 °C with monoclonal anti-HA Agarose beads (Merck) or with anti-Daxx antibodies and Protein G Sepharose beads (Thermo Fisher Scientific). Beads were washed three times in lysis buffer and eluted with 2× SDS loading buffer at 95 °C. For immunoblotting, proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane.

2.8. Immunofluorescence Microscopy

Cells were grown on 12 mm round coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed in PBS, incubated in NH₄Cl 50 mM for 10 min, permeabilized with 0.5% Triton X100 for 15 min and blocked with 0.5% BSA/2% Normal Goat Serum for 10 min. Then, cells were incubated with primary antibodies at room temperature for 30 min. Slides were rinsed in PBS 0.5% BSA and incubated at room temperature in the dark for 30 min with secondary antibodies and rinsed in PBS 0.5% BSA. Finally, slides were washed in PBS, counterstained with Hoechst 33,342, and mounted in Fluoromount-G medium (Thermo Fisher Scientific). Images were digitally acquired with a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.9. Fate-of-Capsid Assays

The HIV-1 core stability in cells was assessed by the separation of soluble CA from CA cores on a sucrose cushion, using the fate-of-capsid assay [56]. At 4 h post transduction, the cells were lysed using hypotonic lysis buffer and a dounce homogenizer and briefly centrifuged to clarify the cytosol fractions. Then, the lysates were layered onto a 50% sucrose cushion and ultracentrifuged at 100,000× g for 2 h. The soluble CA (top 100 µL fraction) and intact cores (pellet) were analyzed by Western blotting of the CA (p24) signal. For the identification of proteins associated with incoming viral cores, we followed the same experimental procedure, except that intact HIV-1 cores were pulled down 2 h post transduction, and only the pellet fractions were analyzed by Western blot.

2.10. RT-QPCR Analyses

Total RNA was extracted using a RNeasy Mini kit and was submitted to DNase treatment (Qiagen), following the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific). In addition, 500 ng of RNA were reverse transcribed with both oligo dT and random primers, using a PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) in a 10 µL reaction. Real-time PCR reactions were performed in duplicate using Takyon ROX SYBR MasterMix blue dTTP (Eurogentec, Liège, Belgium) on an Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). Transcripts were quantified using the following program: 3 min at 95 °C followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 20 s at 72 °C. Values for each transcript were normalized to expression levels of RPL13A (60S ribosomal protein L13a), using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Primers used for quantification of transcripts by real-time quantitative PCR are indicated below:

- RPL13A (human) forward primer, 5'-AACAGCTCATGAGGCTACGG-3' and reverse primer, 5'-TGGGTCTTGAGGACCTCTGT-3';
- Daxx (human) forward primer, 5'-TGCTGGATGATGATGACGAAGAT-3' and reverse primer, 5'-CTCAGAGGAGCTAGGGGCTTC-3';
- PML (human) forward primer, 5'-ATCACCCAGGGGAAAGATGC-3' and reverse primer, 5'-TGAACCTGGGCCTTCACTCT-3';
- IFIT1 (human) forward primer, 5'-AGGACAGGAAGCTGAAGGAG-3' and reverse primer, 5'-AGTGGGTGTTTCCTGCAAGG-3';

- STAT1 (human) forward primer, 5'-CAGAGCCAATGGAACCTTGATGG-3' and reverse primer, 5'-TCCGAGACACCTCGTCAAACCTC-3';
- RPL13A (murine) forward primer, 5'-TGCTGCTCTCAAGGTTGTTCG-3' and reverse primer, 5'-GCATCTTGGCCTTTTCCTTCC-3';
- Daxx (murine) forward primer, 5'-CCCACATCGCCTTCAGACTT-3' and reverse primer, 5'-AGTCCTCTCTTTTGCTGCCC-3';
- PML (murine) forward primer, 5'-TCTGCGCAAGGCACTCTGTAG-3' and reverse primer, 5'-TCTGGGTGATGCAGGAGATGA-3';
- IFIT1 (murine) forward primer, 5'-TCCGTAGGAAACATCGCGTAG-3' and reverse primer, 5'-TGTTGCTTGTAGCAGAGCCC-3'.

2.11. Quantification of HIV-1 Reverse Transcripts by QPCR

For real-time PCR experiments, 12-well plates were seeded with 1.5×10^5 cells per well. The next day, cells were transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 pre-treated with 250 U/mL Benzonase nuclease (Merck) for 20 min at 37 °C. Cells were collected at various timepoints after addition of the virus and total DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Real-time PCR reactions were performed in duplicate using Takyon ROX SYBR MasterMix blue dTTP (Eurogentec) on an Applied Biosystems QuantStudio 5. Transcripts were quantified using the following program: 3 min at 95 °C followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 20 s at 72 °C. Values for each transcript were normalized to expression levels of GAPDH transcripts. The qPCR analysis of HIV-1 early reverse transcription (RT) products was carried out using M667/AA55M primers specific for minus-strand strong stop DNA, whereas late RT products were detected using M667/M661 primers, which amplify the RU5-primer binding site 5' noncoding region, as previously described [40]. Primer sequences were as follows: GAPDH-F, 5'-ACTTCAACAGCGACACCCACT-3'; GAPDH-R, 5'-GTGGTCCAGGGTCTTACTCC-3'; M667, 5'-GGCTAACTAGGGAACCCACTG-3'; AA55M, 5'-GCTAGAGATTTCCACACTGACTAA-3'; and M661, 5'-CCTGCGTCGAGAGAGCTCCTCTGG-3'.

3. Results

3.1. Daxx Is a Mediator of the Type I IFN-Induced Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription

We previously reported that the Daxx protein inhibits HIV-1 replication by interfering with the reverse transcription step [40]. Here, we first investigated whether Daxx was an Interferon-stimulated gene (ISG) product and whether it participated to the type I IFN-induced inhibition of HIV-1 reverse transcription [57,58]. Although a few studies reported that the expression of Daxx mRNA or protein is upregulated by type I IFN in certain murine or human cells, it is still unclear whether Daxx constitutes a bona fide ISG product [49,59]. To answer this question, first, we quantified Daxx mRNA in HeLa cells treated with type I (IFN- α 2 or IFN- β) or type II (IFN- γ) IFN for 24 h. As shown in Figure 1A, although its induction was rather modest as compared with two well-known ISGs such as PML and STAT1, Daxx expression was significantly enhanced by both type I and type II IFNs, and IFN- β was the most potent, leading to a five times enhancement of Daxx mRNA expression. These results were confirmed at the protein level (Figure 1B). Next, we investigated whether the expression of Daxx was also upregulated upon viral infections. We used HeLa and MDTF cells as models of human and murine cells, respectively. Cells were either transduced with a VSV-G pseudotyped HIV-1 vector, or infected with Sendai virus (SeV) for four or 24 h, and the expression of Daxx was quantified both at the mRNA (Figure 1C,D) and the protein level (Figure 1E,F). As a control, HeLa cells were treated by IFN- β , whereas MDTF cells were treated with Universal type I IFN, and both induced a potent enhancement of Daxx protein expression, as shown in Figure 1E (HeLa cells) and Figure 1F (MDTF cells). In both cell types, only SeV triggered a detectable induction of Daxx expression 24 h post infection, but less efficiently than the direct stimulation of cells with IFN (Figure 1C,D).

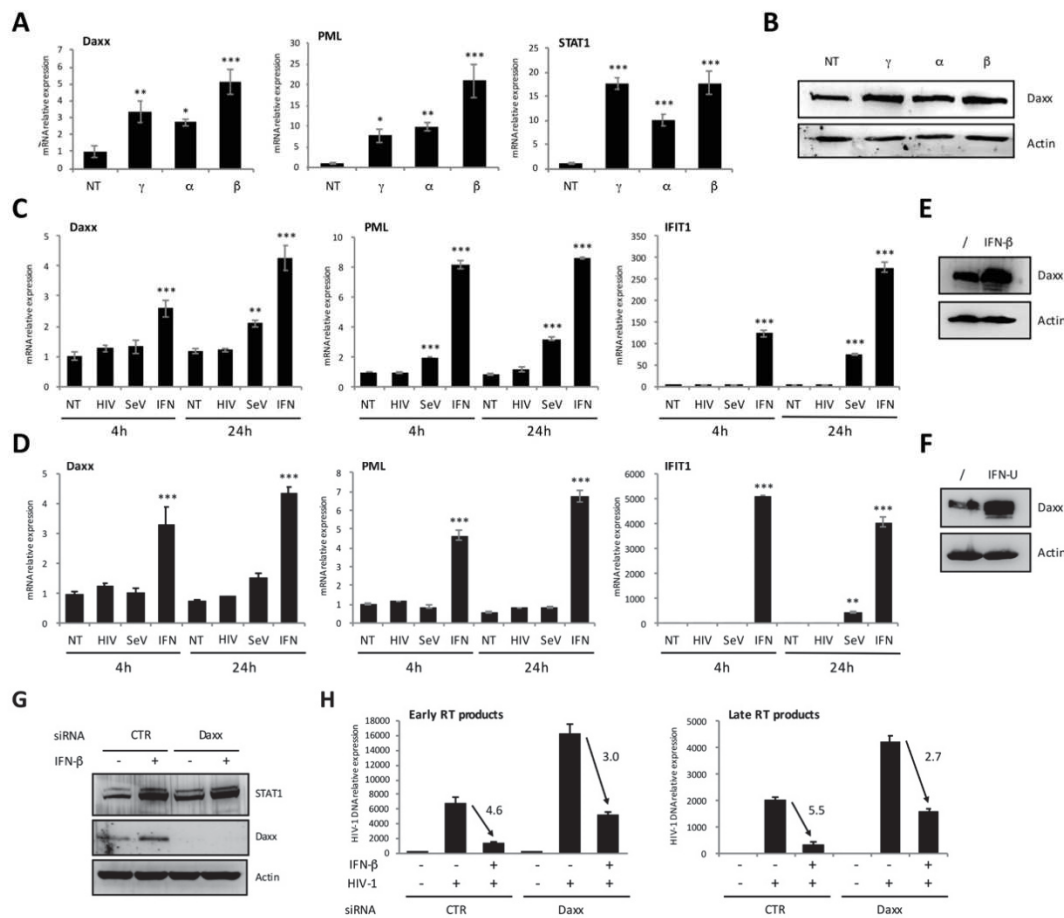


Figure 1. Death domain-associated protein 6 (Daxx) expression is induced by type I and type II interferons (IFNs) and inhibits HIV-1 reverse transcription. (**A,B**) HeLa cells were treated for 24 h with 1000 IU of IFN- α 2, - β , or - γ and the levels of PML and STAT1 expression were assessed by RT-qPCR (**A**), whereas Daxx expression was determined by both RT-qPCR (**A**) and Western blot (**B**); (**C,D**) HeLa (**C**) or MDTF (**D**) cells were either treated with 1000 IU of IFN- β , transduced with VSV-pseudotyped HIV-1 (MOI = 1), or infected with SeV (50 HAU/mL). After 4 or 24 h, the expression levels of Daxx, PML, and IFIT1 were determined by RT-qPCR; (**E,F**) HeLa cells were treated with 1000 IU of IFN- β (**E**) and MDTF were treated with 200 IU of Universal type I IFN (IFN-U) (**F**) and the expression of Daxx was evaluated by Western blot 24 h post treatment; (**G,H**) HeLa cells were transfected with irrelevant (CTR) or Daxx-specific siRNA and treated 24 h later with 1000 IU of IFN- β . After 24 h, the expression levels of Daxx and STAT1 were determined by Western blot (**G**). Then, cells were transduced for 4 h with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 1, and early and late RT products were quantified by qPCR. The IFN-induced inhibition folds in cells transfected with the CTR or the Daxx-specific siRNA are shown on the graphs (**H**). All data correspond to means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ as determined by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (**A, C, D**).

Since it is well established that HIV-1 reverse transcription is inhibited in cells treated with type I IFN [57,58], next, we investigated whether Daxx constituted a mediator of this IFN-induced block. For this purpose, we transfected cells with irrelevant or Daxx-specific siRNA and treated them, or not, with IFN- β before transduction with VSV-G pseudotyped HIV-1. The efficacy of Daxx silencing and the capacity of IFN- β to induce ISG expression were ascertained by Western blot using Daxx and STAT1 antibodies, respectively (Figure 1G). The amount of early and late reverse transcription products was quantified at 4 h post transduction by qPCR. Silencing of Daxx increased the detection of RT products, as previously shown [40]. As shown in Figure 1H, IFN treatment inhibited HIV-1 reverse

transcription nearly five-fold, whereas Daxx silencing reduced this inhibition by 50% (Figure 1H), thus demonstrating that Daxx is one of the ISG contributing to the type I IFN-induced inhibition of HIV-1 reverse transcription.

3.2. The Capacity of Daxx to Interfere with HIV-1 Reverse Transcription Is Dependent on Its SIM Domain

Daxx is a scaffold protein that has been implicated in several biological processes, including apoptosis, cell survival, chromatin remodeling, gene regulation, antiviral defense, or DNA repair, (reviewed in [41–43,60]). The pleiotropic functions of Daxx are due to its capacity to interact with and to connect many different proteins in the cytoplasm and in the nucleus. The identification of a SUMO-interacting motif (SIM) at the C-terminus of Daxx was an important breakthrough in the understanding of Daxx's interaction network [44]. Indeed, almost all Daxx partners are SUMOylated proteins and Daxx interacts with them through its SIM domain. Therefore, this domain is crucial for most Daxx functions and its capability to bind SUMO also controls Daxx SUMOylation [44].

On the basis of this knowledge, we included the following two Daxx mutants in our study: one unSUMOylable Daxx mutant, in which 15 lysines have been mutated to arginines (15KR mutant) and a Δ SIM mutant (Daxx 1-732) lacking the C-terminal SUMO-interacting motif [44] (Figure 2A). In order to determine whether Daxx SUMOylation or the Daxx SIM domain were involved in its antiviral activity, we tested the capacity of these mutants to inhibit HIV-1 reverse transcription.

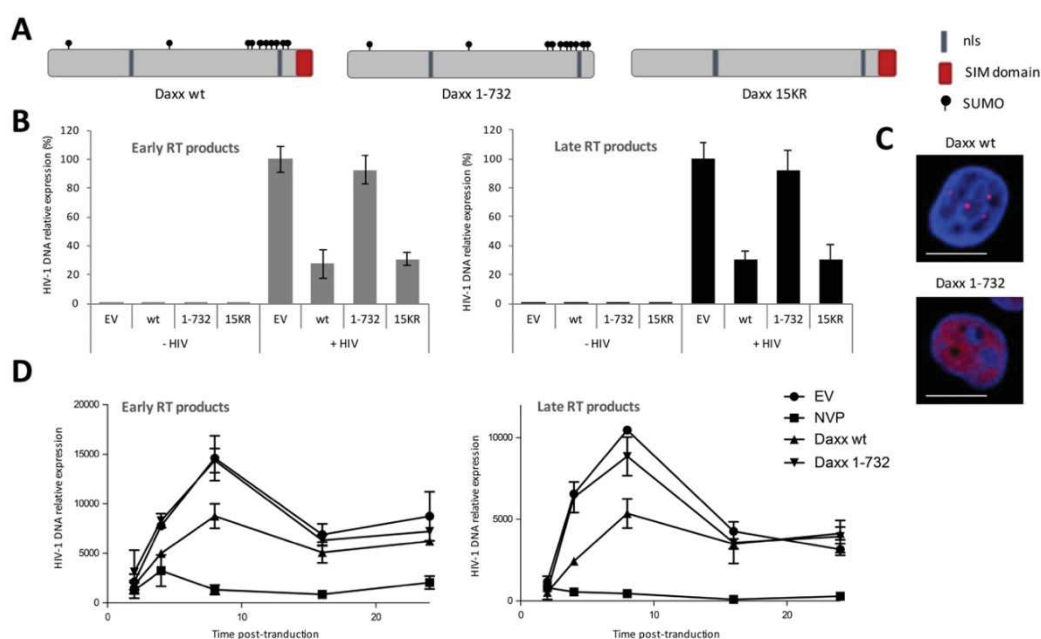


Figure 2. The inhibition of HIV-1 reverse transcription by Daxx requires its SUMO-interacting motif (SIM) domain. (A) Schematic representation of the Daxx wt protein and the 1-732 (Δ SIM) and 15KR mutants described in [44]; (B) HeLa cells were transfected with an empty vector (EV) or with plasmids encoding HA-tagged wt Daxx or 1-732 or 15KR Daxx mutants. Forty-eight hours post transfection, cells were transduced for 4 h with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 1, and early and late RT products were quantified by qPCR. The number of transcripts in the condition EV + HIV was arbitrarily set to 100%. Data represent the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate, representative of three independent experiments; (C) The expression of HA-tagged Daxx wt and 1-732 mutant was investigated by immunofluorescent confocal microscopy using anti-HA antibodies in HeLa cells. Scale bar = 2 μ m; (D) HEK293T cells were transfected with empty vector (EV) or with plasmids encoding Daxx (wt or 1-732). Twenty-four hours post transfection, cells were treated or not with nevirapine (NVP), as indicated, and transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 1 for 2 to 24 h. Following DNA extraction, early and late HIV-1 RT products were quantified by qPCR. Data represent the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate, representative of two independent experiments.

Interestingly, whereas the 15KR Daxx mutant was as efficient as the wt protein to inhibit HIV-1 reverse transcription, the Δ SIM mutant was no longer active (Figure 2B). This indicates that Daxx's own SUMOylation status is not important for its antiviral activity, whereas its SIM domain is strictly required. This SIM domain allows Daxx to interact with its SUMOylated partners, as illustrated by the fact that, unlike the wt protein which is mainly localized within nuclear punctate structures typical of PML nuclear bodies [44,45], the Δ SIM mutant, which can no longer be recruited by SUMOylated PML, is uniformly expressed in the nucleoplasm (Figure 2C). Therefore, these results suggested that Daxx targets a SUMOylated protein, either viral or cellular, to inhibit HIV-1 reverse transcription.

Next, we performed kinetics experiments in order to better characterize the SIM-dependent effect of Daxx on HIV-1 reverse transcription. In particular, we set out to determine whether Daxx delays or blocks reverse transcription, and whether the Δ SIM mutant was inactive during the whole process. Thus, we overexpressed Daxx wt or Δ SIM mutant in HEK293T cells, transduced them with VSV-G pseudotyped HIV-1, and followed the synthesis of RT products over time by qPCR. As shown in Figure 2D, the peak of reverse transcription products occurs at 9 h post transduction in cells transfected with an empty plasmid, and then gradually decreases. As anticipated, treatment with a RT inhibitor (nevirapine) completely abolished reverse transcription (Figure 2D). Results obtained with wt Daxx and the Δ SIM Daxx mutant showed that Daxx inhibits rather than delays reverse transcription and confirmed that the SIM domain of Daxx is necessary for its anti-HIV activity. The fact that Daxx affects the efficacy but not the kinetics of HIV-1 DNA synthesis suggests that Daxx-mediated block is irreversible.

3.3. Daxx Interacts with a Multiprotein Complex Containing CypA, TRIM5 α , and HIV-1 CA

Although we determined that Daxx targeted a SUMOylated protein in order to interfere with HIV-1 reverse transcription, our early findings suggested that it was unlikely to be a viral protein. Therefore, we undertook to identify the cellular proteins that Daxx binds to in HIV-1 infected cells. For this, we used stable-isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics, coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). As templates, we used HEK293T cells transfected with an empty plasmid or with HA-tagged wt or Δ SIM Daxx-expressing plasmids and transduced for 4 h with VSV-G pseudotyped HIV-1. Finally, we performed HA-immunoprecipitations and eluates were processed for mass spectrometry analysis (Figure 3A), after having evaluated the transfections, transduction and IP efficiencies by Western blot (Figure 3B). As shown in Figure 3C and Table 1, Daxx was one of the most abundant recovered proteins, as expected. Among the other most abundant proteins identified by SILAC, well-characterized Daxx partners, such as histone deacetylase 1 (HDAC1) [61], histones H4 and H3.3 [62], PML [45], or p53 [63], were also identified, thereby validating our approach (Figure 3C and Table 1). Surprisingly, SUMO was not identified as an interacting protein, although several enzymes implicated in the SUMOylation machinery were co-immunoprecipitated, including SUMO-interacting enzyme subunits 1 and 2, and the E3 SUMO-protein ligases PIAS1 and RanBP2 (Figure 3C and Table 1).

Interestingly, among the proteins interacting with Daxx, we identified several proteins that are known to bind HIV-1 capsids and to be involved in the early steps of HIV-1 replication, including TNPO1 [23], RanBP2 [64], TNPO3 [24], and CypA [22] (Figure 3C and Table 1). Among these, only RanBP2 has been shown to be SUMOylated [65], however, its main localization within nuclear pores in interphasic cells made us hypothesize it was unlikely to bind to incoming cores.

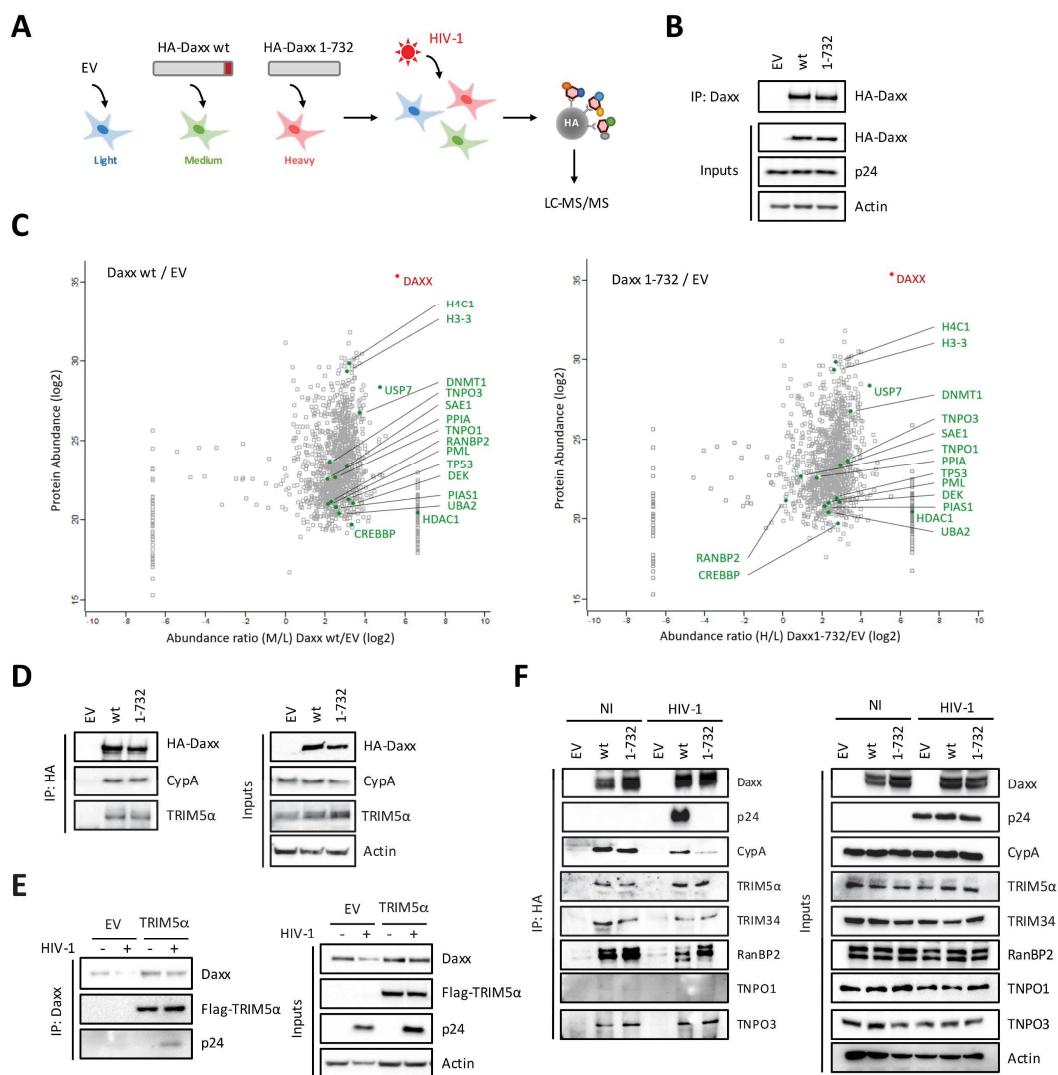


Figure 3. Identification of proteins interacting with Daxx by SILAC. **(A)** Schematic representation of the experimental procedure. HEK293T cells were cultured in medium containing light, medium, or heavy isotopes for 30 days. Then, cells were transfected with empty vector (EV) or with plasmids encoding HA-tagged Daxx wt or 1-732 (Δ SIM mutant). After 24 h, cells were transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 10. At 4 h post transduction, Daxx was immunoprecipitated using anti-HA antibodies and the eluates were mixed in 1:1:1 ratio and subjected to proteomics experiments; **(B)** A fraction of cell extracts was kept for analysis by Western blot in order to evaluate the amount of Daxx and HIV-1 p24 in cell extracts; **(C)** Identification of Daxx interacting partners by SILAC. Graphs show the abundance ratios of proteins in cells expressing Daxx wt (left) or Daxx 1-732 (right) as compared with control cells (EV); **(D)** HEK293T cells were transfected with empty vector (EV) or with plasmids encoding HA-tagged wt Daxx or the 1-732 Daxx mutant. Following Daxx pull-down using anti-HA antibodies, the presence of HA-Daxx and endogenous cyclophilin A (CypA) and TRIM5 α was assessed by Western blot; **(E)** HEK293T cells were transfected with an empty vector (EV) or a Flag-tagged hTRIM5 α -expressing plasmid. Forty-eight hours post transfection, cells were transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 10 for 4 h. Following Daxx pull-down using anti-Daxx antibodies, the presence of Flag-TRIM5 α , HIV-1 p24, and endogenous Daxx was evaluated by Western blot; **(F)** HEK293T cells were transfected with empty vector (EV) or with plasmids encoding HA-tagged wt Daxx or the 1-732 Daxx mutant and were transduced, or not, 24 h later with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 10 for 4 h. Following Daxx pull-down using anti-HA antibodies, the presence of HA-Daxx, HIV p24, and endogenous CypA, TRIM5 α , TRIM34, RanBP2, TNPO1, and TNPO3 was assessed by Western blot. Panels (D–F) show typical results representative of at least two independent experiments.

Table 1. Proteins interacting with Daxx wt or Daxx 1-732, identified using stable-isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).

Protein Name	Symbol	Accession	Abundance Ratio (log2)		Abundance Ratio (log2) Significance A		# Peptides	# Unique Peptides
			Daxx wt/EV	Daxx 1-732/EV	Daxx wt/EV	Daxx 1-732/EV		
Death domain-associated protein 6	DAXX	Q9UER7	5.59	5.55	≤0.05	≤0.05	54	4
Histone deacetylase 1	HDAC1	Q13547	6.64	6.649	≤0.05	≤0.05	2	1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	USP7	Q93009	4.73	4.45	≤0.05	≤0.05	55	55
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	P26358	3.71	3.45	0.1583	0.2876	35	35
Protein DEK	DEK	P35659	3.40	2.91	0.3240	0.7041	2	2
CREB-binding protein	CREBBP	Q92793	3.33	2.81	0.3732	0.8001	3	1
Histone H4	H4C1	P62805	3.22	2.68	0.4595	0.9294	11	11
Cellular tumor antigen p53	TP53	P04637	3.16	2.73	0.5108	0.8793	4	4
Histone H3.3	H3-3A	P84243	3.08	2.61	0.5837	1.0000	6	4
Protein PML	PML	P29590	2.14	2.32	0.6071	0.8042	3	3
SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1	Q9UBE0	3.10	2.95	0.5651	0.6669	8	8
SUMO-activating enzyme subunit 2	UBA2	Q9UBT2	2.70	2.35	0.9781	0.8241	2	2
E3 SUMO-protein ligase PIAS1	PIAS1	O75925	2.53	2.13	0.8864	0.6816	2	2
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	P49792	2.31	0.14	0.7246	≤0.05	4	2
Transportin-1	TNPO1	Q92973	2.50	0.92	0.8639	0.1486	6	6
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	P49792	2.31	0.14	0.7246	≤0.05	4	2
Transportin-3	TNPO3	Q9Y5L0	2.23	3.29	0.6682	0.3894	8	8
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	2.10	1.73	0.5807	0.4520	4	4

Proteins are ordered as follow: In red, Daxx; in green, known Daxx partners; in yellow, enzymes of the SUMO machinery; in blue, proteins known to interact with HIV-1 capsid. #: Number of.

Since several CA binding proteins were strong hits in our proteomic analysis, we hypothesized that Daxx could engage incoming CA within a complex that contains several CA binding proteins, as well as SUMOylated proteins. Since TRIM5 α is a well-established CA binding partner, competing with CypA for binding to CA [38,39], and is also known to be SUMOylated [66,67], it represents a potential candidate protein to be recruited by Daxx. In order to test this hypothesis, we transfected cells with HA-tagged Daxx wt or Δ SIM and immunoprecipitated Daxx using HA-antibodies. Endogenous CypA was pulled down, thus confirming the results obtained by the SILAC approach, as well as TRIM5 α (Figure 3D).

In order to confirm these observations, we repeated the IP experiment but this time we overexpressed Flag-tagged TRIM5 α instead of Daxx and performed the experiment in cells transduced, or not, with VSV-G pseudotyped HIV-1 for 4 h. Following endogenous Daxx IP, we found an interaction between TRIM5 α , Daxx, and HIV-1 CA (p24) in transduced cells (Figure 3E), further suggesting that Daxx resides within a complex that also contains TRIM5 α and CypA, supposedly organized around incoming HIV-1 cores.

In an attempt to better characterize this complex, cells were transfected with HA-tagged Daxx wt or Δ SIM, transduced or not with VSV-G pseudotyped HIV-1 for 4 h and the proteins in complex with Daxx or the Δ SIM mutant were identified by Western blot following IP with anti-HA antibodies (Figure 3F). Independently of HIV-1, Daxx associated with CypA, TRIM5 α , TRIM34, RanBP2, and TNPO3, but not with TNPO1. Strikingly, whereas both Daxx wt and Δ SIM interacted with TRIM5 α , TRIM34, RanBP2, and TNPO3, only Daxx wt was found to associate with HIV-1 capsid and CypA in transduced cells (Figure 3F). This result strongly suggests that Daxx is in a complex with HIV-1 cores and CypA in a SIM-dependent interaction. The lack of SIM domain prevented Daxx from binding to CypA and HIV-1 capsid, and therefore explains why the Δ SIM mutant is devoid of antiviral activity.

3.4. Daxx Associates to Incoming HIV-1 Cores and Interferes with Uncoating

Since we established that Daxx binds to CypA and HIV-1 capsid in a SIM-dependent manner, and could also interact with TRIM5 α , RanBP2, TNPO3, and TRIM34, next, we sought to investigate whether a multiprotein complex containing Daxx formed on incoming HIV-1 cores. Moreover, since our results showed that CA and CypA were the critical determinants in binding to the SIM domain of Daxx, we hypothesized that Daxx associated with incoming cores by binding to CA-bound CypA and recruited additional proteins. If this is true, Daxx should not be able to bind to HIV-1 cores that are devoid of CypA, such as the CypA-binding deficient HIV-1 mutant P90A [33]. To test this hypothesis, we transduced cells for 2 h with VSV-G pseudotyped HIV-1 wt or P90A and intact viral cores were pulled down by ultracentrifugation on a sucrose cushion (Figure 4A). As anticipated, CypA, Daxx, TRIM5 α , TRIM34, TNPO1, and TNPO3 were recovered in the pellet fraction of HIV-1 wt infected cells, associated with intact capsids. With the exception of TNPO1, which has been previously shown to bind P90A CA [23], these were almost absent from the pellet in cells infected with the P90A capsid mutant (Figure 4A). We had already demonstrated that Daxx interfered with HIV-1 reverse transcription and that its SIM domain was required for this activity. Now, our results demonstrate that Daxx binds to incoming HIV-1 cores in a CypA-dependent manner and suggest that it resides within a complex together with TRIM5 α , TRIM34 and TNPO3 (Figure 4B). Interestingly, unlike Daxx and its interacting partners, TNPO1 bound to HIV-1 cores independently of the presence of CypA, in agreement with a recent study [23]. This confirms that TNPO1 binds directly to HIV-1 capsid and does not reside within the CypA/Daxx multiprotein complex. Concerning RanBP2, we failed to detect its presence in this HIV-1 capsid pull-down assay, thus suggesting it is not part of the CypA/Daxx complex. Therefore, it is possible that Daxx and RanBP2 interact independently of HIV-1 infection, possibly through the C-terminal cyclophilin domain of RanBP2 [68].

The Daxx-associated multiprotein complexes assemble onto viral cores during the first steps of HIV-1 replication following viral entry, when reverse transcription, but also uncoating, occur. Since CypA [34,37,69,70], TRIM5 α [14], TNPO3 [37], and TRIM34 [28] have key roles in HIV-1 core integrity, we sought to examine the impact of Daxx expression on HIV-1 uncoating. To address this question, the stability of viral cores was assessed in cells transfected with Daxx wt or Δ SIM and transduced for 4 h with VSV-G pseudotyped HIV-1 using the fate-of-capsid assay (Figure 4C). The cytosol of transduced cells was layered onto a sucrose cushion, after which ultracentrifugation yielded soluble CA in the uppermost fraction and CA cores in the pellet, as previously described [56] (Figure 4C). As shown in Figure 4D,E, whereas a small proportion of CA was recovered in the pellet of empty plasmid- (EV) or Daxx Δ SIM-expressing cells, the amount of intact cores was significantly increased (three-fold) in cells overexpressing wt Daxx, suggesting that Daxx stabilizes HIV-1 cores.

In another set of experiments, we added two conditions where EV-transfected cells were treated with nevirapine or Debio-025, a cyclosporin A analogue that displaces CypA from HIV-1 cores. Once again, the amount of intact HIV-1 cores in wt Daxx-expressing cells was more than three times higher than that in the control cells or in cells expressing the Δ SIM Daxx mutant (Figure 4F), whereas the proportion of HIV-1 CA in the pellet was not much affected by nevirapine or by Debio-025. Altogether, our results are in favor of a model in which Daxx stabilizes incoming HIV-1 cores in a SIM-dependent manner, through the binding of Daxx to CA-bound CypA and the recruitment of other proteins including TRIM5 α , TNPO3, and TRIM34, altogether increasing the stability of viral cores (Figure 4B).

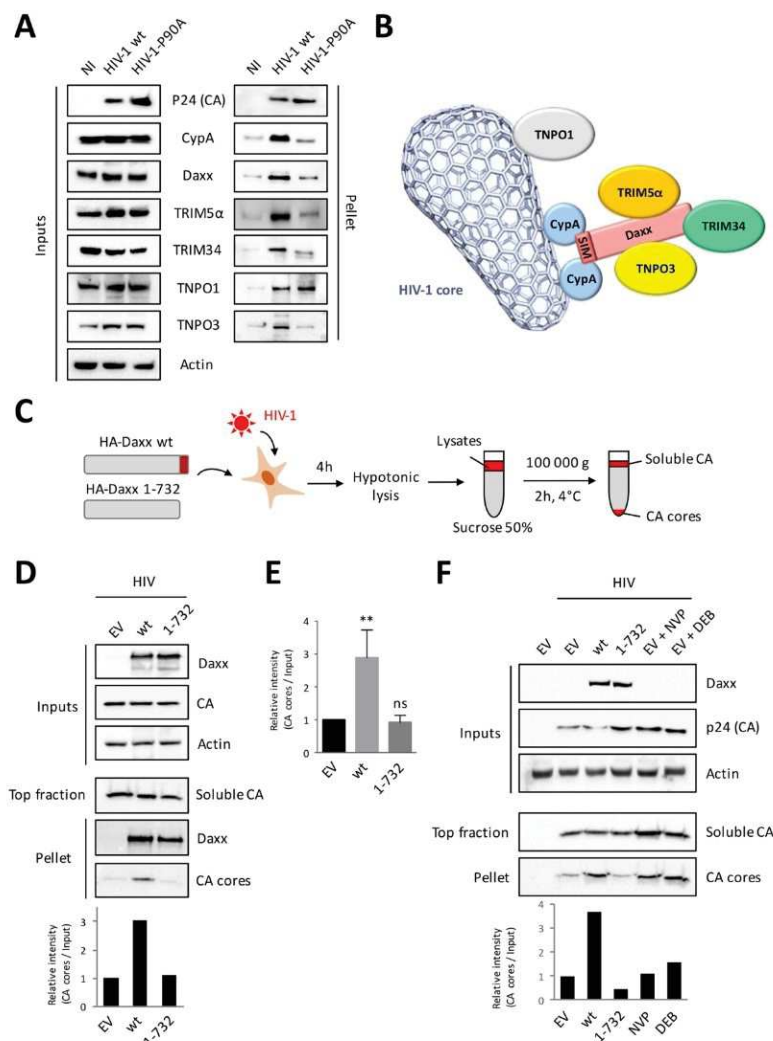


Figure 4. Daxx associated to incoming HIV-1 cores and interferes with their uncoating in a SIM-dependent manner. (A) HEK293T cells were transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 wt or P90A at a MOI of 10 for 2 h. Cells were lysed using hypotonic lysis buffer and a dounce homogenizer, and then the lysates were layered onto a 50% sucrose cushion and ultracentrifuged at 100,000× *g* for 2 h, in order to pull down intact cores (recovered in the pellet). Equal amounts of HIV-1 cores were analyzed by Western blot in order to evaluate the presence of p24 (CA), CypA, Daxx, TRIM5α, TRIM34, TNPO1, and TNPO3; (B) This cartoon represents a model where Daxx interacts with CypA bound to incoming HIV-1 capsids and coordinates the formation of a multiprotein complex containing TRIM5α, TRIM34, and TNPO3. TNPO1, which is not within this complex, binds directly to the viral core [23]; (C) Schematic representation of fate-of-capsid assay; (D) HEK293T cells were transfected with empty vector (EV) or with plasmids encoding HA-tagged Daxx wt or the 1-732 Daxx mutant. Twenty-four hours post transfection, cells were transduced with VSV-G pseudotyped HIV-1 at a MOI of 10 for 4 h. Cells extracts were prepared as in (A) and ultracentrifuged at 100,000× *g* for 2 h on a 50% sucrose cushion, in order to separate soluble CA (top fraction) from intact cores (pellet). Both fractions were analyzed by Western blot using anti-p24 and Daxx antibodies. Quantification of band intensity shows the amount of CA cores relative to inputs (EV set to 1); (E) This graph shows the mean band intensity (amount of CA cores relative to inputs) ±SD of three independent experiments. ** *p* < 0.01; ns, non-significant, as determined by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; (F) The same experimental procedure as in panel (D) was followed, but some cells transfected with EV were treated with nevirapine (NVP) or Debio 025 (DEB025) before HIV-1 transduction. Quantification of band intensity shows the amount of CA cores relative to inputs (EV set to 1).

4. Discussion

While hijacking many cellular proteins to achieve its replication, HIV-1 is also the target of other proteins expressed by host cells in order to limit viral propagation. These factors, known as restriction factors, inhibit HIV-1 at multiple stages of its replication cycle. Some of these antiviral factors are constitutively expressed by host cells, and therefore constitute a first line of defense. These defenses are referred to as intrinsic immunity, which is considered as a third arm of immunity, in addition to the traditionally bipartite immune system of innate and adaptive immunity [1]. Some others are upregulated by type I IFN, and thus are part of innate defenses. Among these, APOBEC3G, TRIM5 α , tetherin, and MxB have been reported to be potent IFN-induced anti-HIV factors [8,9,71–74].

In 2015, we identified Daxx as a new cellular protein that interferes with HIV-1 replication and identified reverse transcription as the step affected [40]. In the present study, we show that like most restriction factors, Daxx expression is upregulated by type I IFNs. Importantly, we also identified Daxx as one of the mediators of the anti-HIV activity triggered by type I IFNs.

Using Daxx mutants, we demonstrated that Daxx needs its SIM domain to inhibit HIV-1 reverse transcription, thus suggesting that it interferes with this step of viral replication by targeting a SUMOylated viral or cellular protein. Two HIV-1 proteins have been shown to be SUMO substrates, p6 [75] and integrase (IN) [76]. We rapidly ruled out the hypothesis that Daxx could access HIV-1 integrase, since it is associated with viral RNA and confined inside capsid cores until they reach the nucleus [17]. However, it is interesting to note that Daxx could interact with retroviral integrases, including that of HIV-1, and was found to inhibit proviral expression, thus suggesting that Daxx could also target HIV-1 in the nucleus after nuclear transport [48,77]. The case of p6 is more puzzling, since in the study by Gurer C et al. demonstrating that HIV-1 p6 was covalently conjugated to SUMO1, they also identified Daxx as a protein interacting with p6 in a SUMO-dependent manner [75]. As such, we performed preliminary experiments to confirm this interaction and the absence of any described role for p6 in the early steps of HIV-1 infection prompted us to perform a global proteomic screen to identify cellular targets of Daxx in HIV-1 infected cells. Using LC-MS/MS, we identified many known partners of Daxx, such as histone deacetylase 1 (HDAC1) [61], histones H4 and H3.3 [62], PML [45], or p53 [63], thus validating the screen. Interestingly, we also identified several well-characterized HIV-1 CA-interacting proteins, including TNPO1 [23], RanBP2 [64], TNPO3 [24], and CypA [22]. Given the central role that HIV-1 CA and its cellular partners play in the early steps of HIV-1 replication, including reverse transcription, we thought these proteins could be involved in the anti-HIV-1 activity of Daxx.

Using classical biochemical experiments, we confirmed that Daxx associates with CypA, as well as with HIV-1 CA in a SIM-dependent manner. If the interaction between the SIM domain of Daxx and CypA is direct, this could imply that CypA is SUMOylated, at least when bound to HIV-1 capsid, a hypothesis that needs to be addressed. Furthermore, we demonstrated that Daxx associates with incoming HIV-1 cores at 2 h post infection and resides within a complex containing CypA, TNPO3, TRIM5 α , and its recently identified cofactor TRIM34 [28]. Whereas human TRIM5 α was believed, until recently, not to have any restriction activity towards HIV-1, its counterparts expressed in old-world monkey are potent inhibitors of HIV-1 reverse transcription through their capacity to bind incoming capsids and trigger their uncoating [8,14]. However, it has recently been shown that human TRIM5 α was also able to block HIV-1 in primary cells, but was counteracted by CypA, which protects incoming cores from its restriction [38,39]. Considering the prominent role that CypA, TNPO3, TRIM5 α , and TRIM34 have on HIV-1 capsid stability [14,28,34,37,69,70], we sought to investigate the potential influence of Daxx on the cytoplasmic fate of incoming cores. Strikingly, the expression of Daxx induced a potent inhibition of HIV-1 uncoating. As with the inhibition of reverse transcription, the Daxx SIM domain was strictly required, since the Δ SIM Daxx mutant was unable to stabilize HIV-1 capsid. Therefore, our results reveal that Daxx is both able to inhibit HIV-1 reverse transcription and to prevent uncoating. Since these are two tightly interdependent processes that occur concomitantly during the first hours of HIV-1 replication, further studies are required to determine which event is the cause and which one is the consequence [15,16,18,19]. However, the timing and location of HIV-1 uncoating have

been under debate for more than a decade, pointing out the difficulty to decipher these complex steps of HIV-1 replication [15,17,23,78].

Altogether, our results suggest that, through a SIM-dependent interaction with CA-bound CypA and the recruitment of a complex containing TRIM5 α , TRIM34, and TNPO3, Daxx associates with and stabilizes HIV-1 cores, thus preventing uncoating and reverse transcription. This model fits with the known function of Daxx, which acts as a scaffold to bridge different proteins [41–43]. Interestingly, TNPO1, which was recently shown to orchestrate HIV-1 uncoating and nuclear import [23], was not present in Daxx's complex. Unlike Daxx and its interacting partners, TNPO1 bound as efficiently to wt and P90A HIV-1 capsids, thus confirming that the association of TNPO1 with incoming HIV-1 cores is independent of the presence of CypA [23].

Interestingly, Daxx was recently identified in a CRISPR-based screen aiming to identify ISGs that inhibit HIV-1 infection in THP-1 cells [28]. This screen allowed the identification of genes whose knockout rescues the IFN-induced inhibition of viral replication, such as genes implicated in IFN signaling as well as restriction factors. Daxx was the 43rd highest-scoring gene identified in the screen, a lower rank than MxB, tetherin or TRIM5, but higher than other well-known anti-HIV ISGs, such as IFITM3 or TRIM22 [28]. Strikingly, unlike the other antiviral ISGs, Daxx was no longer found when the same screen was performed using the HIV-1 P90A capsid mutant [28], thus confirming that Daxx is an anti-HIV ISG and also reinforcing the pertinence of our model in which Daxx targets HIV-1 cores by binding to CypA.

On the whole, our study answers many questions regarding the molecular mechanism underlying Daxx-mediated HIV-1 restriction, but it also opens new routes of investigation. For instance, although we identified multiprotein complexes containing Daxx, CypA, TRIM5 α , TRIM34, and TNPO3 that associate with incoming HIV-1 capsids, other potentially important factors could also be present and need to be identified. Among these proteins, we need to determine which ones are directly involved in the inhibition of uncoating or reverse transcription and which ones are dispensable.

In a previous work, we found that Daxx overexpression inhibited wt HIV-1 spreading infection in activated PBMCs [40]. However, since all experiments described in the present study were performed using VSV-G pseudotyped virus and immortalized cell lines, further studies are required to confirm our findings in a physiological model of HIV-1-infection in human primary cells.

Another important question remains to be addressed. Indeed, we previously showed that Daxx inhibited reverse transcription of HIV-1, and also of SIVmac and MLV, and was even able to interfere with the retrotransposition of endogenous retroviruses [40]. Since CypA does not bind SIVmac or MLV capsid, it is unlikely to participate in these Daxx-mediated antiviral activities [32]. TRIM5 α , in contrast, could be involved, since it displayed a much broader activity and has even been shown to restrict endogenous retroviruses [79]. In any case, further studies are required in order to determine whether Daxx employs virus-specific or a common mechanism to interfere with retroviral infections.

Author Contributions: S.M., J.F., F.P.B., N.J.A., G.M., and S.N. performed the experiments; M.D. and K.E.K. performed the proteomic analyses; all authors participated in experimental design and analyses; S.N. wrote the manuscript with input from all of the authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Labex EpiGenMed: an Investissements d'Avenir program (ANR-10-LABX-12-01). S.M. and G.M. were supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS). J.F. was supported by a grant from Sidaction.

Acknowledgments: Mass spectrometry experiments were performed using facilities of the Functional Proteomics Platform of Montpellier.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bieniasz, P.D. Intrinsic immunity: A front-line defense against viral attack. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 1109–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Bergantz, L.; Subra, F.; Deprez, E.; Delelis, O.; Richetta, C. Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. *Cells* **2019**, *8*, 922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hotter, D.; Kirchhoff, F. Interferons and beyond: Induction of antiretroviral restriction factors. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *103*, 465–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sheehy, A.M.; Gaddis, N.C.; Choi, J.D.; Malim, M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **2002**, *418*, 646–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Simon, V.; Bloch, N.; Landau, N.R. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Colomer-Lluch, M.; Ruiz, A.; Moris, A.; Prado, J.G. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2876. [[CrossRef](#)]
7. Ghimire, D.; Rai, M.; Gaur, R. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 435–446. [[CrossRef](#)]
8. Stremlau, M.; Owens, C.M.; Perron, M.J.; Kiessling, M.; Autissier, P.; Sodroski, J. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **2004**, *427*, 848–853. [[CrossRef](#)]
9. Harris, R.S.; Bishop, K.N.; Sheehy, A.M.; Craig, H.M.; Petersen-Mahrt, S.K.; Watt, I.N.; Neuberger, M.S.; Malim, M.H. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **2003**, *113*, 803–809. [[CrossRef](#)]
10. Laguette, N.; Sobhian, B.; Casartelli, N.; Ringeard, M.; Chable-Bessia, C.; Seeger, E.; Yatim, A.; Emiliani, S.; Schwartz, O.; Benkirane, M. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **2011**, *474*, 654–657. [[CrossRef](#)]
11. Hrecka, K.; Hao, C.; Gierszewska, M.; Swanson, S.K.; Kesik-Brodacka, M.; Srivastava, S.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Skowronski, J. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* **2011**, *474*, 658–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ambrose, Z.; Aiken, C. HIV-1 uncoating: Connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology* **2014**, *454*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fassati, A. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res.* **2012**, *170*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Stremlau, M.; Perron, M.; Lee, M.; Li, Y.; Song, B.; Javanbakht, H.; Diaz-Griffero, F.; Anderson, D.J.; Sundquist, W.I.; Sodroski, J. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5514–5519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hulme, A.E.; Perez, O.; Hope, T.J. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9975–9980. [[CrossRef](#)]
16. Yang, Y.; Fricke, T.; Diaz-Griffero, F. Inhibition of reverse transcriptase activity increases stability of the HIV-1 core. *J. Virol.* **2013**, *87*, 683–687. [[CrossRef](#)]
17. Arhel, N.J.; Souquere-Besse, S.; Munier, S.; Souque, P.; Guadagnini, S.; Rutherford, S.; Prevost, M.C.; Allen, T.D.; Charneau, P. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* **2007**, *26*, 3025–3037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, H.; Dornadula, G.; Orenstein, J.; Pomerantz, R.J. Morphologic changes in human immunodeficiency virus type 1 virions secondary to intravirion reverse transcription: Evidence indicating that reverse transcription may not take place within the intact viral core. *J. Hum. Virol.* **2000**, *3*, 165–172.
19. Rankovic, S.; Varadarajan, J.; Ramalho, R.; Aiken, C.; Rousso, I. Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00289. [[CrossRef](#)]
20. Aiken, C. Viral and cellular factors that regulate HIV-1 uncoating. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2006**, *1*, 194–199. [[CrossRef](#)]
21. Hilditch, L.; Towers, G.J. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *4*, 32–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Luban, J.; Bossolt, K.L.; Franke, E.K.; Kalpana, G.V.; Goff, S.P. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **1993**, *73*, 1067–1078. [[CrossRef](#)]
23. Fernandez, J.; Machado, A.K.; Lyonais, S.; Chamontin, C.; Gartner, K.; Leger, T.; Henriquet, C.; Garcia, C.; Portilho, D.M.; Pugniere, M.; et al. Transportin-1 binds to the HIV-1 capsid via a nuclear localization signal and triggers uncoating. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1840–1850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Valle-Casuso, J.C.; Di Nunzio, F.; Yang, Y.; Reszka, N.; Lienlaf, M.; Arhel, N.; Perez, P.; Brass, A.L.; Diaz-Griffero, F. TNPO3 is required for HIV-1 replication after nuclear import but prior to integration and binds the HIV-1 core. *J. Virol.* **2012**, *86*, 5931–5936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. De Iaco, A.; Santoni, F.; Vannier, A.; Guipponi, M.; Antonarakis, S.; Luban, J. TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm. *Retrovirology* **2013**, *10*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Di Nunzio, F.; Fricke, T.; Miccio, A.; Valle-Casuso, J.C.; Perez, P.; Souque, P.; Rizzi, E.; Severgnini, M.; Mavilio, F.; Charneau, P.; et al. Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology* **2013**, *440*, 8–18. [[CrossRef](#)]
27. Li, X.; Gold, B.; O'HUigin, C.; Diaz-Griffero, F.; Song, B.; Si, Z.; Li, Y.; Yuan, W.; Stremlau, M.; Mische, C.; et al. Unique features of TRIM5alpha among closely related human TRIM family members. *Virology* **2007**, *360*, 419–433. [[CrossRef](#)]
28. Ohainle, M.; Kim, K.; Komurlu Keceli, S.; Felton, A.; Campbell, E.; Luban, J.; Emerman, M. TRIM34 restricts HIV-1 and SIV capsids in a TRIM5alpha-dependent manner. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008507. [[CrossRef](#)]
29. Misumi, S.; Inoue, M.; Dochi, T.; Kishimoto, N.; Hasegawa, N.; Takamune, N.; Shoji, S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 25185–25195. [[CrossRef](#)]
30. Lee, K.; Ambrose, Z.; Martin, T.D.; Oztop, I.; Mulky, A.; Julias, J.G.; Vandegraaff, N.; Baumann, J.G.; Wang, R.; Yuen, W.; et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe* **2010**, *7*, 221–233. [[CrossRef](#)]
31. Yamashita, M.; Engelman, A.N. Capsid-Dependent Host Factors in HIV-1 Infection. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 741–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Franke, E.K.; Yuan, H.E.; Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **1994**, *372*, 359–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gamble, T.R.; Vajdos, F.F.; Yoo, S.; Worthylake, D.K.; Houseweart, M.; Sundquist, W.I.; Hill, C.P. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **1996**, *87*, 1285–1294. [[CrossRef](#)]
34. Braaten, D.; Franke, E.K.; Luban, J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J. Virol.* **1996**, *70*, 3551–3560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yin, L.; Braaten, D.; Luban, J. Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6430–6436. [[CrossRef](#)]
36. Ylinen, L.M.; Schaller, T.; Price, A.; Fletcher, A.J.; Noursadeghi, M.; James, L.C.; Towers, G.J. Cyclophilin A levels dictate infection efficiency of human immunodeficiency virus type 1 capsid escape mutants A92E and G94D. *J. Virol.* **2009**, *83*, 2044–2047. [[CrossRef](#)]
37. Shah, V.B.; Shi, J.; Hout, D.R.; Oztop, I.; Krishnan, L.; Ahn, J.; Shotwell, M.S.; Engelman, A.; Aiken, C. The host proteins transportin SR2/TNPO3 and cyclophilin A exert opposing effects on HIV-1 uncoating. *J. Virol.* **2013**, *87*, 422–432. [[CrossRef](#)]
38. Selyutina, A.; Persaud, M.; Simons, L.M.; Bulnes-Ramos, A.; Buffone, C.; Martinez-Lopez, A.; Scoca, V.; Di Nunzio, F.; Hiatt, J.; Marson, A.; et al. Cyclophilin A Prevents HIV-1 Restriction in Lymphocytes by Blocking Human TRIM5alpha Binding to the Viral Core. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3766–3777. [[CrossRef](#)]
39. Kim, K.; Dauphin, A.; Komurlu, S.; McCauley, S.M.; Yurkovetskiy, L.; Carbone, C.; Diehl, W.E.; Strambio-De-Castillia, C.; Campbell, E.M.; Luban, J. Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5alpha. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 2044–2051. [[CrossRef](#)]
40. Dutrieux, J.; Maarifi, G.; Portilho, D.M.; Arhel, N.J.; Chelbi-Alix, M.K.; Nisole, S. PML/TRIM19-Dependent Inhibition of Retroviral Reverse-Transcription by Daxx. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005280. [[CrossRef](#)]
41. Tang, S.Y.; Wan, Y.P.; Wu, Y.M. Death domain associated protein (Daxx), a multi-functional protein. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2015**, *20*, 788–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Maillat, S.; Nisole, S. Daxx, a broad-spectrum viral restriction factor. *Virologie* **2016**, *20*, 261–272. [[PubMed](#)]
43. Mahmud, I.; Liao, D. DAXX in cancer: Phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 7734–7752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Lin, D.Y.; Huang, Y.S.; Jeng, J.C.; Kuo, H.Y.; Chang, C.C.; Chao, T.T.; Ho, C.C.; Chen, Y.C.; Lin, T.P.; Fang, H.I.; et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 341–354. [[CrossRef](#)]
45. Ishov, A.M.; Sotnikov, A.G.; Negorev, D.; Vladimirova, O.V.; Neff, N.; Kamitani, T.; Yeh, E.T.; Strauss, J.F., 3rd; Maul, G.G. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 221–234. [[CrossRef](#)]
46. Woodhall, D.L.; Groves, I.J.; Reeves, M.B.; Wilkinson, G.; Sinclair, J.H. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37652–37660. [[CrossRef](#)]
47. Kivipold, P.; Vosa, L.; Ustav, M.; Kurg, R. DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. *Viol. J.* **2015**, *12*, 104. [[CrossRef](#)]
48. Greger, J.G.; Katz, R.A.; Ishov, A.M.; Maul, G.G.; Skalka, A.M. The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J. Virol.* **2005**, *79*, 4610–4618. [[CrossRef](#)]
49. Shalginskikh, N.; Poleshko, A.; Skalka, A.M.; Katz, R.A. Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx. *J. Virol.* **2013**, *87*, 2137–2150. [[CrossRef](#)]
50. Arriagada, G.; Muntean, L.N.; Goff, S.P. SUMO-interacting motifs of human TRIM5alpha are important for antiviral activity. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002019. [[CrossRef](#)]
51. Strahle, L.; Garcin, D.; Kolakofsky, D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **2006**, *351*, 101–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, F.; Perez-Caballero, D.; Hatzioannou, T.; Bieniasz, P.D. No effect of endogenous TRIM5alpha on HIV-1 production. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 235–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J.V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860. [[CrossRef](#)]
54. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 731–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yang, Y.; Luban, J.; Diaz-Griffero, F. The fate of HIV-1 capsid: A biochemical assay for HIV-1 uncoating. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1087*, 29–36. [[PubMed](#)]
57. Meylan, P.R.; Guatelli, J.C.; Munis, J.R.; Richman, D.D.; Kornbluth, R.S. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* **1993**, *193*, 138–148. [[CrossRef](#)]
58. Goujon, C.; Malim, M.H. Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9254–9266. [[CrossRef](#)]
59. Shimoda, K.; Kamesaki, K.; Numata, A.; Aoki, K.; Matsuda, T.; Oritani, K.; Tamiya, S.; Kato, K.; Takase, K.; Imamura, R.; et al. Cutting edge: tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN-alpha-induced suppression of B lymphocyte formation. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4707–4711. [[CrossRef](#)]
60. Schreiner, S.; Wodrich, H. Virion factors that target Daxx to overcome intrinsic immunity. *J. Virol.* **2013**, *87*, 10412–10422. [[CrossRef](#)]
61. Li, H.; Leo, C.; Zhu, J.; Wu, X.; O’Neil, J.; Park, E.J.; Chen, J.D. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 1784–1796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Elsasser, S.J.; Huang, H.; Lewis, P.W.; Chin, J.W.; Allis, C.D.; Patel, D.J. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* **2012**, *491*, 560–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zhao, L.Y.; Liu, J.; Sidhu, G.S.; Niu, Y.; Liu, Y.; Wang, R.; Liao, D. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50566–50579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Di Nunzio, F.; Danckaert, A.; Fricke, T.; Perez, P.; Fernandez, J.; Perret, E.; Roux, P.; Shorte, S.; Charneau, P.; Diaz-Griffero, F.; et al. Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46037. [[CrossRef](#)]
65. Pichler, A.; Gast, A.; Seeler, J.S.; Dejean, A.; Melchior, F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **2002**, *108*, 109–120. [[CrossRef](#)]

66. Dutrieux, J.; Portilho, D.M.; Arhel, N.J.; Hazan, U.; Nisole, S. TRIM5alpha is a SUMO substrate. *Retrovirology* **2015**, *12*, 28. [[CrossRef](#)]
67. Maarifi, G.; Fernandez, J.; Portilho, D.M.; Boulay, A.; Dutrieux, J.; Oddos, S.; Butler-Browne, G.; Nisole, S.; Arhel, N.J. RanBP2 regulates the anti-retroviral activity of TRIM5alpha by SUMOylation at a predicted phosphorylated SUMOylation motif. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 193. [[CrossRef](#)]
68. Yokoyama, N.; Hayashi, N.; Seki, T.; Pante, N.; Ohba, T.; Nishii, K.; Kuma, K.; Hayashida, T.; Miyata, T.; Aebi, U.; et al. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* **1995**, *376*, 184–188. [[CrossRef](#)]
69. Li, Y.; Kar, A.K.; Sodroski, J. Target cell type-dependent modulation of human immunodeficiency virus type 1 capsid disassembly by cyclophilin A. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10951–10962. [[CrossRef](#)]
70. De Iaco, A.; Luban, J. Cyclophilin A promotes HIV-1 reverse transcription but its effect on transduction correlates best with its effect on nuclear entry of viral cDNA. *Retrovirology* **2014**, *11*, 11. [[CrossRef](#)]
71. Goujon, C.; Moncorge, O.; Bauby, H.; Doyle, T.; Ward, C.C.; Schaller, T.; Hue, S.; Barclay, W.S.; Schulz, R.; Malim, M.H. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* **2013**, *502*, 559–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Neil, S.J.; Zang, T.; Bieniasz, P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **2008**, *451*, 425–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Carthagen, L.; Parise, M.C.; Ringard, M.; Chelbi-Alix, M.K.; Hazan, U.; Nisole, S. Implication of TRIM5alpha and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities. *Retrovirology* **2008**, *5*, 59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Peng, G.; Lei, K.J.; Jin, W.; Greenwell-Wild, T.; Wahl, S.M. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 41–46. [[CrossRef](#)]
75. Gurer, C.; Berthou, L.; Luban, J. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J. Virol.* **2005**, *79*, 910–917. [[CrossRef](#)]
76. Zamborlini, A.; Coiffic, A.; Beauclair, G.; Delelis, O.; Paris, J.; Koh, Y.; Magne, F.; Giron, M.L.; Tobaly-Tapiero, J.; Deprez, E.; et al. Impairment of human immunodeficiency virus type-1 integrase SUMOylation correlates with an early replication defect. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21013–21022. [[CrossRef](#)]
77. Huang, L.; Xu, G.L.; Zhang, J.Q.; Tian, L.; Xue, J.L.; Chen, J.Z.; Jia, W. Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 241–245. [[CrossRef](#)]
78. Burdick, R.C.; Li, C.; Munshi, M.; Rawson, J.M.O.; Nagashima, K.; Hu, W.S.; Pathak, V.K. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 5486–5493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Kaiser, S.M.; Malik, H.S.; Emerman, M. Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein. *Science* **2007**, *316*, 1756–1758. [[CrossRef](#)]



Les résultats suivants regroupent les optimisations réalisées en amont des expériences présentées dans l'article, ainsi que des résultats complémentaires obtenus au cours de ma thèse.

II. Identification des partenaires de Daxx par spectrométrie de masse

Daxx n'ayant aucune activité enzymatique décrite à ce jour, les premières études menées sur l'inhibition de la transcription inverse suggéraient que Daxx exerce sa fonction antivirale par l'intermédiaire d'un partenaire cellulaire ou viral SUMOylé. Une première partie de mon travail de thèse consistait donc à identifier ce ou ces partenaires, grâce à une analyse menée à large échelle par spectrométrie de masse. Avant d'exploiter la stratégie SILAC, une première analyse *label free* avait d'abord été envisagée.

A. Spectrométrie de masse *label free*

La spectrométrie de masse est une technique protéomique qui a pour but d'identifier les protéines présentes dans un échantillon biologique. Ces protéines subissent une digestion enzymatique par la trypsine, qui génère un mélange de peptides. Ces derniers sont ensuite ionisés et leur passage au travers du spectromètre de masse génère un spectre spécifique, en fonction de leur masse et de leur charge. En comparant les spectres obtenus pour chaque peptide à ceux répertoriés dans des banques de données particulières, comme RefProteome utilisée dans notre analyse, les protéines composant l'échantillon initial sont ainsi identifiées. L'approche sans marquage appelée *label free* ne nécessite aucune préparation particulière des échantillons en amont de l'analyse, et permet de comparer un nombre illimité de conditions. C'est une approche quantitative, où l'intensité du spectre d'un peptide reflète sa quantité dans l'échantillon analysé.

L'interactome issu des cellules transfectées par la forme sauvage de Daxx est comparé à celui des cellules exprimant la forme tronquée (Δ SIM). Dans toutes les conditions analysées, les cellules ont au préalable été transfectées par la technique du phosphate de calcium, puis transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G. Il s'agit d'un vecteur composé des enzymes et des protéines de structures du VIH-1, mais dont l'enveloppe a été remplacée par la glyco-protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Etant à la recherche de partenaires cellulaires ou viraux intervenant au cours de la transcription inverse du VIH-1, je me suis intéressée aux interactions que Daxx établit dans un contexte d'infection. Les échantillons analysés correspondent donc uniquement à des conditions dans lesquelles les cellules ont été transduites. L'étiquette de Daxx, HA, a été immunoprécipitée, et les

extraits ont été envoyés à la plate-forme de spectrométrie de masse de Montpellier. Avant de mettre en place ce type d'analyse, chaque étape de la transfection à l'immunoprécipitation a dû être optimisée.

1. Optimisation de la transfection

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité de transfection d'un plasmide, comme le type cellulaire ou le plasmide qui est transfecté. Dans le but d'avoir le meilleur taux de transfection possible, trois paramètres ont été étudiés : la quantité de plasmide transfectée, le réactif de transfection à privilégier, et le temps de transfection (Figure 22). Dans chacune de ces mises au point, l'efficacité de la transfection est évaluée par cytométrie en flux, en détectant l'expression de l'étiquette HA, portée par les plasmides d'expression de Daxx. L'expérience de spectrométrie de masse se déroulant en boîtes de Petri, l'ensemble des mises au point a été fait dans ce format.

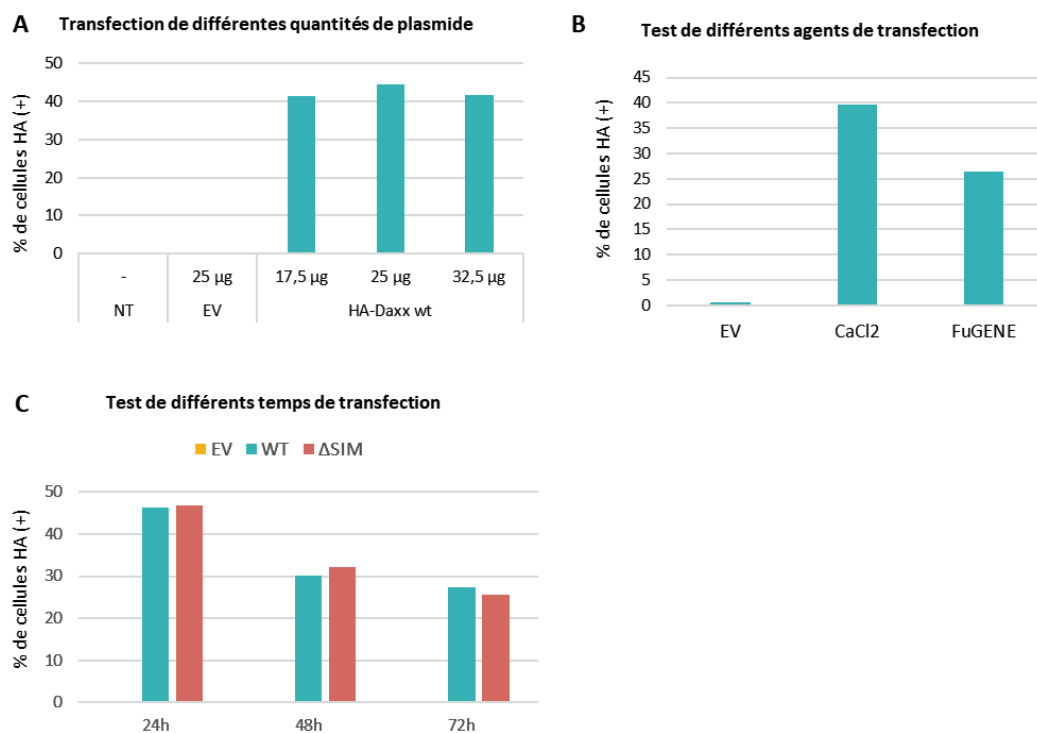


Figure 22 : Mises au point des conditions de transfection du plasmide HA-Daxx

A. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec des quantités croissantes de plasmide (quantités indiquées pour une boîte de Pétri). 48h plus tard, les cellules ont été fixées et l'expression de HA a été analysée par cytométrie en flux. **B.** Des cellules HEK293T ont été transfectées par un plasmide vide (EV) ou un plasmide codant la forme sauvage de Daxx, à l'aide de deux agents de transfection : CaCl₂ ou FuGENE. 48h plus tard, les cellules ont été fixées et l'expression de l'étiquette HA a été analysée par cytométrie en flux. **C.** Des cellules HEK293T ont été transfectées 24h, 48h, ou 72h par un plasmide vide (EV), ou les formes sauvages (WT) ou mutantes (ΔSIM) de Daxx. Les cellules ont ensuite été fixées et l'expression de l'étiquette HA a été analysée par cytométrie en flux

Le premier paramètre testé est la quantité de plasmide à transférer. Trois quantités de plasmide ont été transférées pendant 48h au phosphate de calcium dans des cellules HEK293T. Les résultats ne montrent pas de différence majeure d'expression suivant la quantité de plasmide transférée (Figure 22-A). Dans la suite des expériences, 25 µg de plasmide pour 5 millions de cellulesensemencées la veille seront transférés, quantité standard utilisée dans le laboratoire pour la transfection de cellules HEK293T en boîte de Pétri. Le deuxième paramètre pouvant influencer l'efficacité de transfection est le réactif utilisé pour transférer les cellules. Ici, j'ai testé le phosphate de calcium et le FuGENE, deux agents utilisés en routine dans notre laboratoire. Les résultats de la Figure 22-B montrent qu'on obtient une meilleure expression du plasmide HA-Daxx WT lorsque celui-ci est transféré au phosphate de calcium. Pour l'expérience de spectrométrie de masse, nous utiliserons donc cet agent de transfection. Le dernier paramètre à déterminer est le temps de transfection. J'ai donc fait une cinétique de transfection, en analysant l'expression de l'étiquette HA 24h, 48h, ou 72h après transfection. D'après les résultats présentés dans la Figure 22-C, les formes sauvages et mutantes de Daxx s'expriment nettement mieux 24h après la transfection des cellules. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que Daxx est une protéine impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'apoptose, ou la répression de l'expression de certains gènes. De ce fait, sa surexpression pourrait être délétère pour la cellule.

2. Optimisation de la transduction

Deux techniques utilisées dans notre laboratoire ont été testées en vue d'améliorer l'efficacité de transduction des cellules : la spinoculation, et le traitement au DEAE-Dextran. La spinoculation consiste à centrifuger les cellules transduites à faible vitesse dans le but de rapprocher les particules virales des membranes cellulaires et favoriser l'attachement des vecteurs aux cellules. Le DEAE-Dextran est un polycation qui se fixe au niveau de la membrane des pseudo-particules virales afin de limiter la répulsion liée aux charges négatives des membranes cellulaires et virales. Plusieurs doses de vecteur ont également été testées. Le pourcentage de cellules transduites est contrôlé par cytométrie en flux, par un marquage intracellulaire de la protéine Gag (Figure 23).

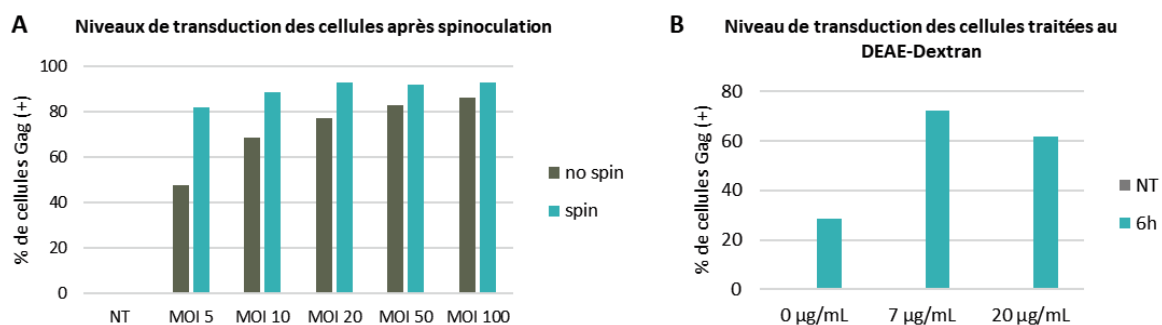


Figure 23 : Mises au point des conditions de transduction du vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G

A. Des cellules HEK293T ont été transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G à différentes MOI, puis spinoculées 2h à 1 200 g. 4h plus tard, les cellules ont été fixées et la protéine Gag a été analysée par cytométrie en flux. **B.** Des cellules HeLa ont été transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G à MOI10, en présence ou non de deux doses de DEAE-Dextran (7 ou 20 µg/mL). Après 6h de transduction, ces cellules ont été fixées et la protéine Gag a été analysée par cytométrie en flux.

A partir de MOI 20, près de 80% des cellules sont transduites, et cela sans spinoculation. Augmenter la quantité de vecteur au-delà de cette dose n'améliore pas l'efficacité de transduction (Figure 23-A). Comme nous l'attendions, plus de 80 % des cellules ont été transduites suite à la spinoculation, contre 47% sans spinoculation, et ce dès MOI5, plus petite dose de vecteur testée (Figure 23-A). La même expérience a été répétée en plaque 6 puits, mais dans cette configuration, le tapis cellulaire s'est décollé pendant la centrifugation. Cette technique de transduction n'est donc pas applicable dans le cadre de l'expérience de spectrométrie de masse que nous souhaitons mener. L'utilisation du DEAE-Dextran est une alternative envisageable à la spinoculation. Deux doses de Dextran ont été testées, pour une même quantité de vecteur transduite (Figure 23-B). Le traitement au Dextran multiplie par plus de deux le pourcentage de cellules transduites. A la plus faible concentration de Dextran testée, 7 µg/mL, celui-ci suffit à augmenter l'efficacité de transduction.

3. Optimisation de l'immunoprécipitation

Etant à la recherche d'un partenaire de Daxx, vraisemblablement cytoplasmique puisqu'il exerce son activité restrictive 4h après la transduction des cellules, nous avons décidé de mener l'analyse de spectrométrie de masse sur la fraction cytoplasmique des cellules transduites. J'ai comparé la pureté des fractions cytoplasmiques obtenues avec un protocole du laboratoire (L) à celles issues du fractionnement par un kit commercial (K) (Figure 24-A).

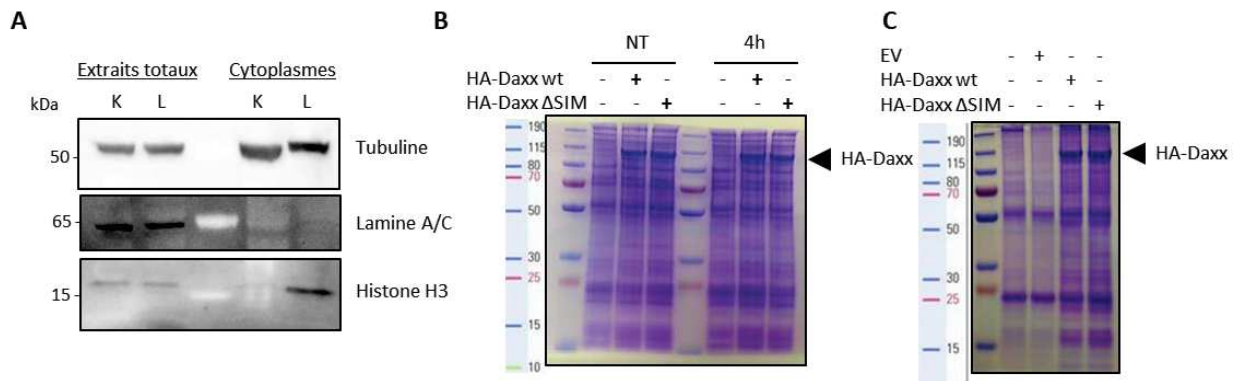


Figure 24 : Mises au point des conditions d'immunoprécipitation

A. Les fractions subcellulaires de cellules HEK293T ont été séparées à l'aide d'un kit commercial de fractionnement (K) ou d'un protocole mis au point dans le laboratoire (L). Les différentes fractions ont été analysées par western blot à l'aide de marqueurs spécifiques du cytoplasme (tubuline) et des noyaux (lamine A/C et histones H3). **B et C.** Des cellules HEK293T ont été transfectées ou non par un plasmide vide (EV), la forme sauvage (WT) ou mutante (Δ SIM) de Daxx. 48h plus tard, les cellules ont été transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G pendant 6h (B), puis l'étiquette HA a été immunoprécipitée dans les fractions cytoplasmiques. Deux méthodes de lavage des billes d'immunoprécipitation ont été comparées dans les figures B et C. Les gels marqués au bleu de Coomassie sont présentés.

Deux marqueurs nucléaires ont été utilisés pour contrôler la pureté des fractions cytoplasmiques. La lamine A/C n'a pas été détectée dans les cytoplasmes, contrairement à l'histone H3, détecté dans la fraction cytoplasmique issue du protocole du laboratoire uniquement. Ces observations suggèrent une contamination nucléaire de la fraction cytoplasmique isolée en suivant le protocole du laboratoire. Pour la suite de l'étude, il est donc préférable d'utiliser le kit commercial pour obtenir des fractions aussi pures que possible.

Le dernier paramètre à optimiser était l'immunoprécipitation de l'étiquette HA. Pour cela, j'ai utilisé des billes d'agarose couplées à un anticorps HA, et suivi le protocole conseillé par le fournisseur. Dans une première expérience présentée en Figure 24-B, les billes ont été lavées quatre fois au PBS. Après élution, les extraits ont été déposés sur gel, et l'ensemble des protéines a été coloré au bleu de Coomassie. De nombreuses protéines sont visibles dans les conditions non transfectées, malgré l'absence d'étiquette HA à immunoprécipiter. Il s'agit de protéines contaminantes se fixant directement aux billes, qui constituent le bruit de fond de l'immunoprécipitation. Dans une deuxième expérience présentée en Figure 24-C, les billes ont été lavées dans des conditions plus stringentes : trois fois, pendant quinze minutes à l'aide d'un tampon de lyse de type RIPA. La quantité de protéines contaminantes immunoprécipitées reste limitée par rapport à la première expérience. Dans ces conditions, les fractions immunoprécipitées, plus pures, sont de meilleure qualité pour conduire une analyse de spectrométrie.

4. Résultats de la spectrométrie de masse *label free*

L'expérience mise en place suite aux optimisations précédentes est présentée dans la Figure 25-A. Des cellules HEK293T ont été transfectées au phosphate de calcium pendant 24h avec un plasmide vide (EV), ou codant pour la forme sauvage (WT) ou mutante (Δ SIM) de Daxx, puis transduites par un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G. Six heures plus tard, un fractionnement avec un kit commercial permet d'isoler les fractions cytoplasmiques, et l'étiquette HA a été immunoprécipitée dans chaque échantillon. Avant de déposer les échantillons à la plateforme, j'ai contrôlé la transfection et la transduction des cellules par cytométrie en flux, puis la pureté des fractions cytoplasmiques, et l'immunoprécipitation de l'étiquette HA par western blot.

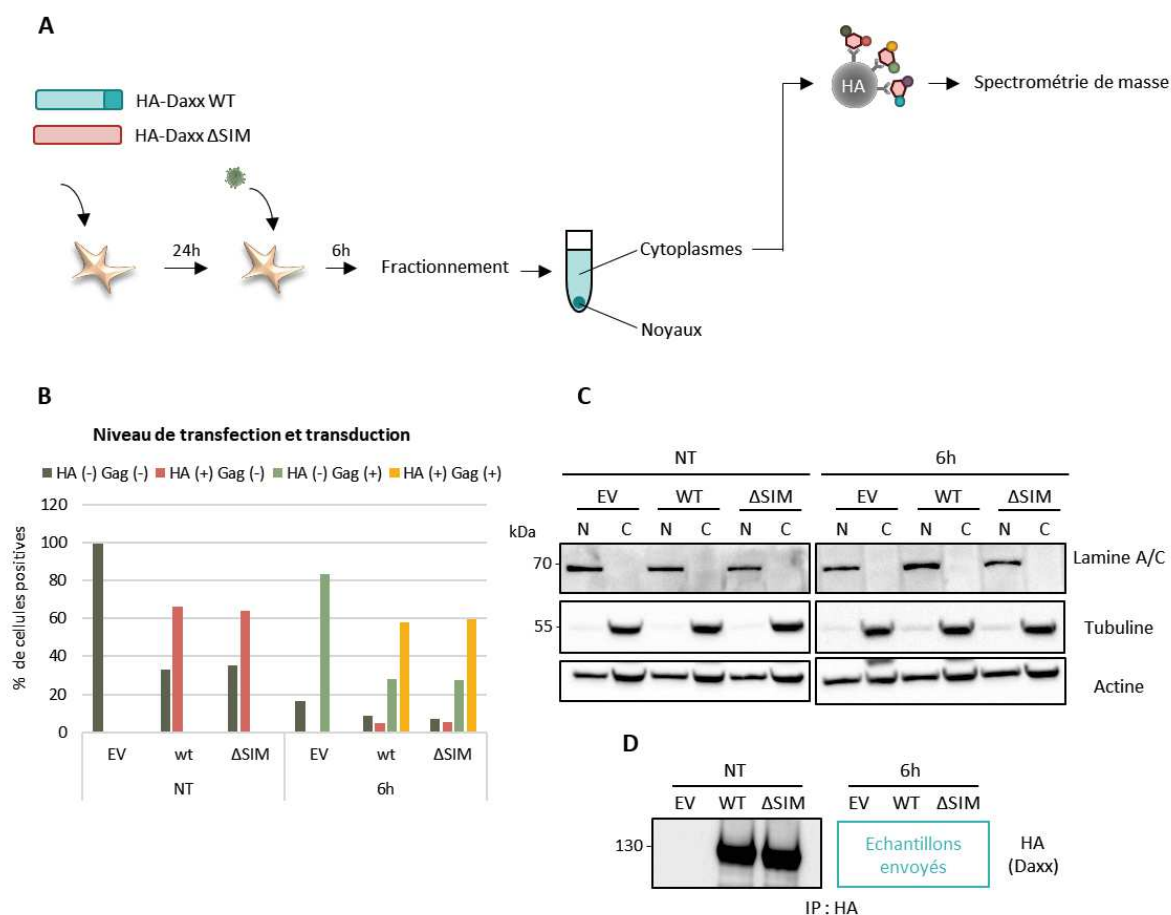


Figure 25 : Expérience de spectrométrie de masse *label free*

A. Schéma de l'expérience mise en place pour la spectrométrie de masse *label free*. Des cellules HEK293T ont été transfectées au phosphate de calcium par un plasmide vide (EV), la forme sauvage (WT) ou mutante (Δ SIM) de Daxx. 24h plus tard, les cellules ont été transduites 6h avec un vecteur VIH-1 pseudotypé VSV-G en présence de 7 μ g/mL de DEAE-Dextran à MOI35. L'étiquette HA a été immunoprécipitée dans les fractions cytoplasmiques, et les échantillons obtenus ont été envoyés à la plateforme de spectrométrie. **B.** Les niveaux de transfection (HA) et de transduction (Gag) des cellules ont été évalués par cytométrie en flux. NT : Non Transduit. **C.** La pureté des fractions nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) a été analysée par western blot, par l'utilisation de marqueurs

spécifiques des noyaux (Lamine A/C) et des cytoplasmes (Tubuline). L'actine sert de contrôle de charge. **D.** L'immunoprécipitation de l'étiquette HA a été contrôlée dans les trois conditions non transduites par western blot. Les échantillons transduits ont été déposés à la plateforme de spectrométrie de masse pour analyse.

Selon les résultats de la cytométrie en flux (Figure 25-B), environ 60% des cellules transfectées sont également transduites. Les fractions cytoplasmiques sont pures, sans contamination nucléaire, puisque la lamine A/C est détectée dans les noyaux uniquement (Figure 25-C). Les échantillons transduits étant destinés à l'analyse protéomique, le contrôle de l'immunoprécipitation de l'étiquette HA n'a été mené que sur les échantillons non transduits de la même expérience. Le western blot confirme une immunoprécipitation de l'étiquette HA uniquement dans les conditions où le plasmide HA-Daxx a été transfecté (Figure 25-D). L'ensemble de ces contrôles montre que les conditions sont optimales pour poursuivre l'analyse : les échantillons sont donc déposés à la plateforme de spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines co-immunoprécipitées avec Daxx.

Les résultats de l'analyse de spectrométrie sont résumés dans la Figure 26 et le Tableau 1.

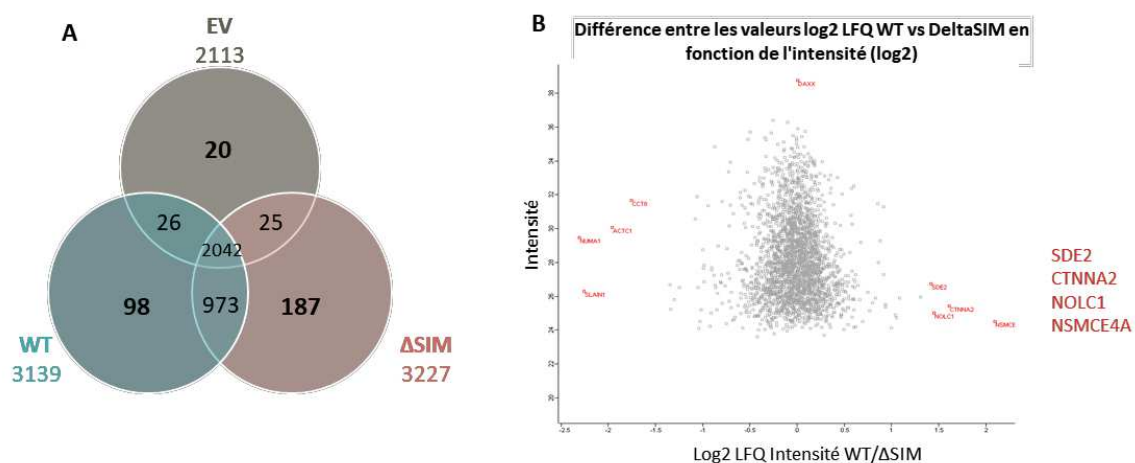


Figure 26 : Résultats de la spectrométrie de masse label free

A. Diagramme de Venn résumant le nombre de protéines identifiées dans chacune des conditions. **B.** Représentation sous forme de nuage de points des résultats de la spectrométrie de masse. Les protéines en rouge représentent les candidats dont l'intensité varie entre les conditions sauvages (WT) et mutante (ΔSIM).

Plus de 3 000 protéines ont été identifiées dans ce crible, et parmi elles, deux tiers sont retrouvés dans les trois conditions : il s'agit de protéines contaminantes qui ne seront pas retenues pour l'analyse (Figure 26-A). Le graphe de la Figure 26-B représente les rapports d'intensité pour chaque protéine identifiée, sous forme de nuage de points. Il ne s'agit cependant pas d'un « volcano plot » puisqu'aucune analyse statistique n'a été réalisée : l'expérience devrait être répétée encore deux fois pour permettre un traitement statistique des données. Comme nous l'attendions, la protéine la plus

abondante retrouvée dans ce crible est la protéine Daxx, ce qui confirme son enrichissement dans les échantillons suite à son immunoprécipitation.

Nom de la protéine	Symbole	Accession	Différence d'intensité normalisée (log2)			# peptides	# peptides uniques	% de recouvrement	# MS/MS
			WT - EV	Δ SIM - EV	WT - Δ SIM				
Death domain-associated protein 6	DAXX	Q9UER7	NaN	NaN	NaN	51	1	62,6	2
DAXX-delta SIM	DAXX-deltaSIM	Q9UER7-deltaSIM	8,892980576	8,887552261	0,005428314	52	2	62,2	3356
Transcriptional regulator ATRX	ATRX	P46100	1,521150589	1,315092087	0,206058502	12	12	7,5	21
Histone deacetylase 1	HDAC1	Q13547	0,06883049	0,303277969	-0,234447479	11	6	33,2	34
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	UBP7	Q93009	3,159399033	3,156658173	0,00274086	75	75	76,7	424
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	P26358	-0,178852081	-0,198513031	0,01966095	3	3	2,1	4
Histone H4	H4	P62805	4,358629227	4,354875565	0,003753662	12	12	57,3	249
Histone H3.3	H33	P84243	6,138719559	6,093322754	0,045396805	11	4	66,2	85
Protein PML	PML	P29590	-0,040370941	0,342216492	-0,382587433	4	4	6	9
SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1	Q9UBE0	NaN	NaN	NaN	2	2	7,8	4
SUMO-activating enzyme subunit 2	SAE2	Q9UBT2	0,275127411	-0,473079681	0,748207092	3	3	4,8	4
SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBC9	P63279	-0,295862198	-0,323329926	0,027467728	3	3	14,6	14
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RBP2	P49792	-0,197780609	-0,190460205	-0,007320404	24	16	11,7	42
E3 SUMO-protein ligase NSE2	NSE2	Q96MF7	NaN	NaN	NaN	2	2	15	2
Small ubiquitin-related modifier 1	SUMO1	P63165	-0,769245148	-0,421648026	-0,347597122	2	2	19,8	3
Small ubiquitin-related modifier 2	SUMO2	P61956	NaN	NaN	NaN	1	1	12,6	8
Replication stress response regulator SDE2	SDE2	Q6IQ49	NaN	NaN	1,417837143	2	2	6,4	5
Catenin alpha-2	CTNA2	P26232	0,674339294	-0,9367733	1,611112595	9	3	14,3	6
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	Q14978	NaN	NaN	1,447856903	3	3	5	6
Non-structural maintenance of chromosomes element 4 homolog A	NSE4A	Q9NXX6	NaN	NaN	2,092039108	3	3	8,6	5
Transportin-1	TNPO1	Q92973	0,678857803	0,726131439	-0,047273636	11	11	14,8	21
Transportin-3	TNPO3	Q9Y5L0	NaN	NaN	-0,265947342	3	3	4,8	3
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RBP2	P49792	-0,197780609	-0,190460205	-0,007320404	24	16	11,7	42
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	Q16630	-1,343595505	-1,349874496	0,006278992	7	7	17,6	21
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	-0,420272827	-0,493974686	0,073701859	8	8	56,4	30

Tableau 1 : Résultats de la spectrométrie de masse label free

Liste des protéines interagissant avec les formes sauvages et/ou mutantes de Daxx, identifiées par spectrométrie de masse label free.

Rouge : protéine Daxx. Vert : partenaires connus de Daxx. Jaune : protéines impliquées dans la voie de SUMOylation. Marron : protéines enrichies dans la condition sauvage par rapport à la condition mutante. Bleu : protéines connues pour interagir avec la capsid.

D'autres partenaires connus de Daxx, par exemple ATRX (Xue et al. 2003), PML (Ishov et al. 1999), ou l'histone déacétylase HDAC1 (Li et al. 2000) (Tableau 1), ont également été retrouvés dans ce crible, ce qui valide la procédure mise en œuvre. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans la machinerie de SUMOylation ont été identifiées, ce qui n'est pas surprenant compte tenu du fait que Daxx est SUMOylé (Jang et al. 2002). SUMO1 et SUMO2 sont d'ailleurs retrouvés dans l'analyse. D'autre part, en recherchant des partenaires connus de la capsid ayant un rôle décrit dans l'une des étapes précoces du cycle réplcatif du VIH-1, des cibles potentielles telles que TNPO1 (Fernandez et al. 2019) ou CypA (Luban et al. 1993) ressortent de ce premier crible.

Même si tous ces partenaires ont bel et bien été identifiés dans cette étude protéomique, l'enrichissement de ces cibles dans les conditions transfectées par Daxx par rapport à la condition contrôle (EV) n'est pas très marqué. Il est donc difficile de se prononcer sur la pertinence de ces

identifications. Si on s'intéresse plus spécifiquement aux protéines enrichies dans la condition WT par rapport à la condition Δ SIM, quatre protéines ressortent et sont listées en rouge, à droite du graphe de la Figure 26-B. Ces cibles potentielles ne sont pas décrites pour interagir avec Daxx dans la littérature et n'ont aucun effet connu dans l'infection par le VIH-1. Si l' α caténine 2 (CTNNA2) est une protéine cytoplasmique dont le rôle principal est d'assurer l'adhésion entre les cellules en se liant à la cadherin (Pokutta et al. 2008), SDE2, NOLC1, NSE4A sont des protéines nucléaires impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, l'assemblage des ribosomes ou la formation du nucléole et la réparation de l'ADN respectivement (Jo et al. 2016; Chen et al. 1999; Horváth et al. 2020). Il est donc peu probable que ces protéines interviennent en collaboration avec Daxx dans le cytoplasme, pour inhiber la transcription inverse du VIH-1.

Pour résumer ces données, aucun partenaire intéressant ne ressort de cette première analyse puisque les cibles variant significativement d'une condition à l'autre sont majoritairement nucléaires, et n'ont aucun effet antiviral décrit à ce jour. En outre, parmi les cibles identifiées, celles interférant avec l'une des étapes précoces du cycle répliatif du VIH-1 ne varient pas nettement entre les conditions Daxx sauvage ou mutante et la condition contrôle (EV). Plusieurs critiques peuvent être soulevées vis-à-vis de cette première analyse protéomique. Malgré des fractions cytoplasmiques qui paraissaient pures en western blot (Figure 25-C), un très grand nombre de protéines nucléaires ont été identifiées, ce qui pose la question de l'utilité de cette étape. D'autre part, nous sommes à la recherche d'un partenaire dont l'interaction avec Daxx dépend de la SUMOylation. Le fractionnement cellulaire ayant été réalisé à l'aide d'un kit commercial, aucun inhibiteur de désSUMOylase n'a été ajouté au tampon au moment de la lyse, ce qui favorise le risque de perte de certaines interactions SUMO-dépendantes. Pour terminer, nous étions à la recherche d'un partenaire qui serait enrichi dans la condition WT et perdu dans la condition Δ SIM. En réalité, le domaine SIM stabilise une interaction existante entre deux protéines (Lin et al. 2006; Shen et al. 2006). Il est donc important de pouvoir quantifier l'enrichissement observé dans chaque condition, pour ne pas chercher une présence ou absence entre les conditions sauvages et mutantes, mais plutôt une diminution de l'enrichissement dans la condition mutante par rapport à la condition sauvage. Dans cette optique, nous avons entrepris un second type d'analyse, grâce à la technique de SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*) couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), qui présente l'avantage de fournir des données de quantification plus précises que l'approche *label free*.

B. SILAC

Cette technique consiste à cultiver les cellules dans des milieux contenant des acides aminés naturels, ou « légers », ou des équivalents dont la masse a été augmentée par un marquage isotopique stable ^{13}C ^{15}N . L'écart de masse induit par l'incorporation de ces acides aminés plus ou moins lourds par les protéines néosynthétisées est facilement visible sur les spectres issus de l'analyse par spectrométrie de masse. La première étape consiste donc à vérifier le taux d'incorporation de ces isotopes au sein des protéines synthétisées.

1. Test d'incorporation des isotopes

Des cellules HEK293T ont été mises en culture dans trois milieux différents contenant un couple d'isotopes légers (K0 R0), moyens (K4 R6) ou lourds (K8 R10) (Figure 27-A). Après deux semaines de culture, une fraction des cellules a été lysée afin de déterminer le taux d'incorporation des isotopes, c'est-à-dire la proportion de protéines ayant intégrée les acides aminés marqués, tandis que le reste des cellules a été maintenu en culture. Ce paramètre est calculé par la plateforme de spectrométrie de masse.

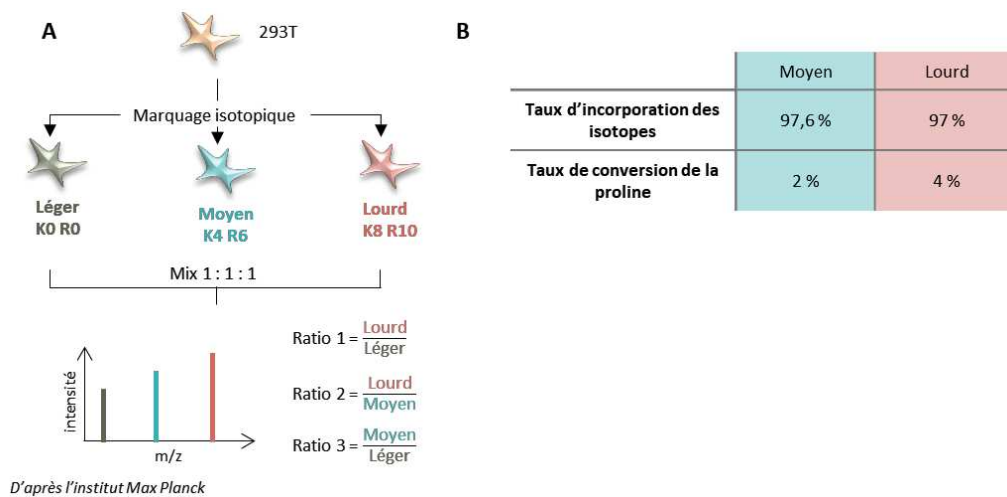


Figure 27 : Principe du SILAC

A. Schéma du marquage isotopique stable des cellules en culture. **B.** Des cellules HEK293T ont été mises en culture dans un milieu particulier contenant différents isotopes. Deux semaines plus tard, les cellules ont été lysées et analysées par la plateforme de spectrométrie de masse afin de déterminer le taux d'incorporation des isotopes d'une part, et le taux de conversion de l'arginine en proline d'autre part.

Pour une analyse SILAC, le taux d'incorporation des isotopes doit être compris entre 95% et 100%. Ici, les résultats montrent un bon taux d'incorporation puisque 97% des protéines néosynthétisées ont

incorporé les isotopes moyens ou lourds (Figure 27-B). Le deuxième paramètre à prendre en compte est le taux de conversion de la proline. En effet, lorsque l'arginine se trouve en excès dans le milieu de culture comme c'est le cas dans le milieu SILAC, elle peut être convertie en proline, redistribuant alors le marquage, et faussant la quantification. Afin de limiter cette conversion, de la proline non marquée a été ajoutée dans chaque milieu de culture, en supplément de la lysine et de l'arginine marquées. Ici le taux de conversion reste limité, et n'excède pas 4% (Figure 27-B).

2. Optimisation de l'expérience SILAC

Une fois l'incorporation des isotopes validée, plusieurs agents de transfection ont été comparés pour optimiser l'expression des plasmides Daxx dans les cellules marquées pour le SILAC. Le plasmide HA-Daxx sauvage a été transfecté au phosphate de calcium, à la Lipofectamine2000, ou au JetPEI dans chacune des populations cellulaires (Figure 28). La Lipofectamine2000 est l'agent de transfection donnant les meilleurs résultats, avec environ 40% de cellules transfectées dans chacune des lignées isotopiquement marquées.

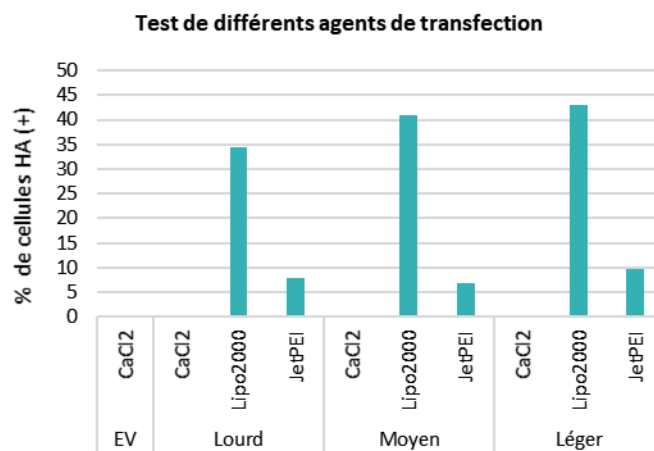


Figure 28 : Résultats du SILAC

Des cellules HEK293T cultivées en milieu lourd, moyen ou léger ont été transfectées à l'aide de phosphate de calcium, Lipofectamine2000 ou JetPEI, avec un plasmide vide (EV) ou codant la forme sauvage (WT) de Daxx. 24h plus tard, l'expression de l'étiquette HA est analysée par cytométrie en flux.

Les détails de l'expérience SILAC mise en place et les résultats associés ont été présentés dans l'article.

III. Etude des partenaires viraux de Daxx

Les partenaires viraux n'ont pas été étudiés en SILAC, leur détection étant limitée par leur présence en faible quantité dans les échantillons. De plus, les vecteurs utilisés pour la transduction n'étant pas produits dans les cellules cultivées en milieu SILAC, aucune protéine virale marquée n'a pu être incorporée au cours de leur production. Il aurait donc été impossible de déterminer leur échantillon d'origine, les trois conditions SILAC étant mélangées avant leur passage au spectromètre de masse. Néanmoins, parmi les protéines cellulaires identifiées dans le crible, certaines, telles que CypA, ou TNPO1 sont des partenaires connus de la capsid (Luban et al. 1993) (Fernandez et al. 2019). L'article montre en effet une interaction entre Daxx et la capsid, interaction qui dépend de la région SIM de Daxx.

Nous nous sommes également intéressés à l'interaction entre Daxx et p6, l'une des deux protéines du VIH-1 rapportée dans la littérature comme étant SUMOylée (Gurer et al. 2005). Cet article montrait également une interaction entre Daxx et la forme SUMOylée de p6 par crible double hybride. Les formes sauvages de Daxx et p6 ont été surexprimées dans des cellules HEK293T pendant 48h, puis l'étiquette HA a été immunoprécipitée.

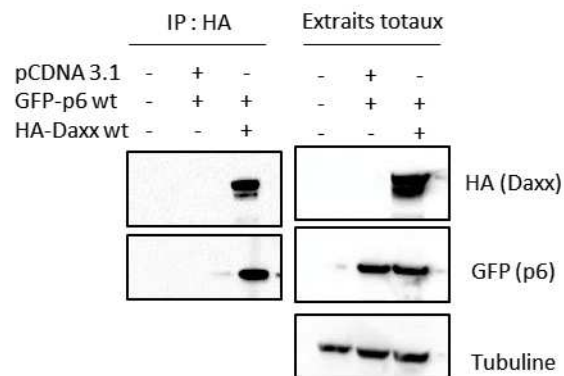


Figure 29 : Daxx interagit avec la protéine virale p6

Des cellules HEK293T ont été co-transfectées 48h avec les plasmides indiqués au phosphate de calcium. L'étiquette HA a ensuite été immunoprécipitée, et les étiquettes GFP et HA ont été détectées par western blot dans les extraits totaux et les fractions immunoprécipitées.

Les résultats confirment l'interaction entre les formes sauvages de Daxx et p6 (Figure 29). Pour aller plus loin et déterminer si cette interaction dépend de la SUMOylation de p6, il faudrait répéter cette expérience en incluant le mutant Δ SIM de Daxx, et un mutant non SUMOylé de p6, le mutant K27R (Gurer et al. 2005).

IV. Autres observations

A. Productions de lentivecteurs HA-Daxx

L'ensemble des expériences présentées a été réalisé en cellules HEK293T ou HeLa. Dans le but de répéter certaines d'entre elles dans des modèles plus physiologiques comme dans des lignées de type Jurkat ou dans des cellules primaires, l'une des stratégies de surexpression que nous avons explorées est la production de lentivecteurs d'expression codant les formes sauvages ou mutantes de Daxx. La stratégie de clonage mise en place est présentée dans la Figure 30-A. Le fragment codant Daxx est extrait du plasmide de départ pcDNA3.1 par digestion enzymatique EcoRI – XbaI. L'étiquette HA et les sites de restriction des enzymes BamHI et Xho sont ajoutés par PCR. Le fragment obtenu est alors transféré dans un plasmide intermédiaire, pCR2.1-TOPO, par la technique de TOPO-TA cloning. Le plasmide obtenu et le plasmide final pTRIP, un lentivecteur d'expression, sont tous deux digérés par les enzymes BamHI et XhoI. Les fragments HA-Daxx WT ou Δ SIM sont ensuite ligués dans le plasmide pTRIP. En cotransfectant le plasmide ainsi obtenu avec p8.74, codant les gènes *gag* et *pol* du VIH-1, et pVSV-G, codant la glycoprotéine d'enveloppe du VSV, dans des cellules HEK293T, des lentivecteurs codant les formes sauvages ou mutantes de Daxx sont produits. En parallèle, un lentivecteurs contrôle est également produit : il s'agit d'un plasmide pTRIP codant les dix premiers acides aminés de la GFP et contenant l'étiquette HA (HA-X).

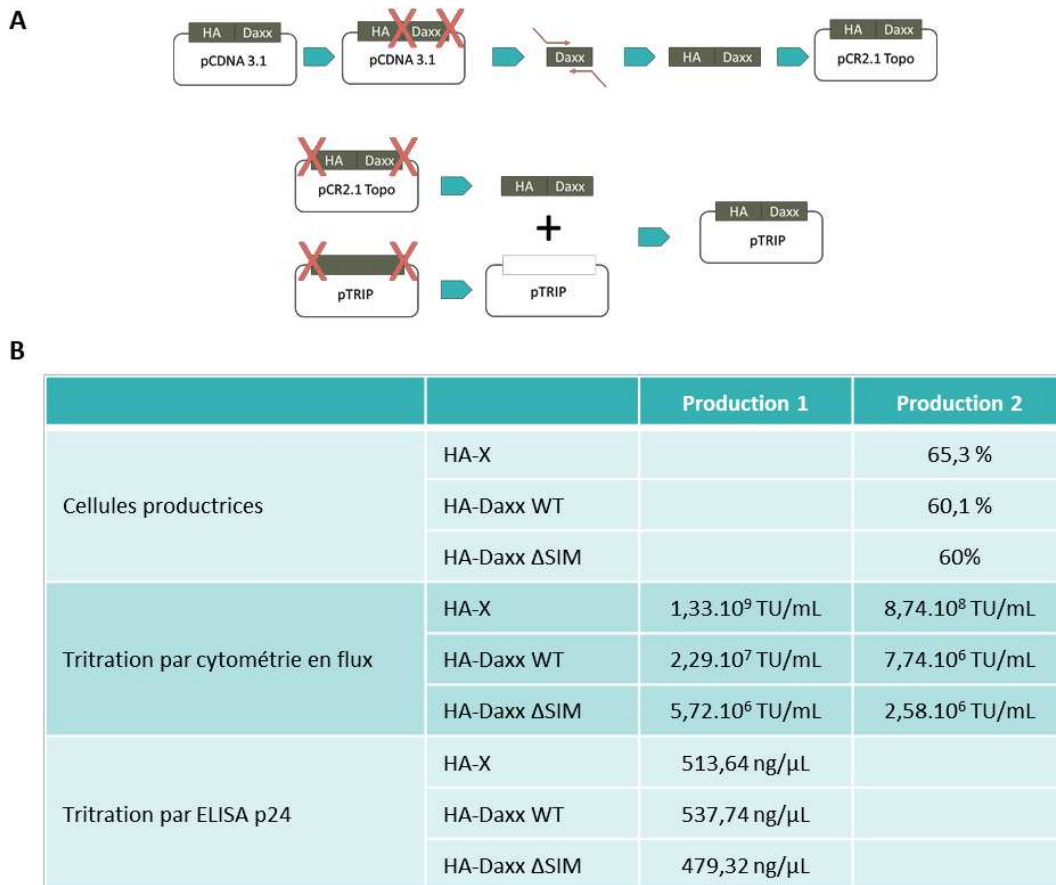


Figure 30 : Production de lentivecteurs exprimant Daxx

A. Stratégie de clonage mise en place pour cloner Daxx en lentivecteur. **B.** Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les plasmides issus du clonage présenté, p8.74 et pVSV-G. Les productions obtenues ont été titrées en cellules par cytométrie en flux, ou par ELISA p24. L'expression de l'étiquette HA est contrôlée dans les cellules productrices de la deuxième production par cytométrie en flux. Les résultats sont résumés dans le tableau.

Deux lots de lentivecteurs ont été produits et titrés soit en cellules en mesurant l'expression de l'étiquette HA par cytométrie en flux, soit par ELISA p24 (Figure 30-B). Les titrations par ELISA p24 montrent des titres équivalents entre les vecteurs codant Daxx et le vecteur contrôle (HA-X). En revanche, lorsque ces mêmes vecteurs sont titrés en cellules, les vecteurs Daxx sont cent fois moins infectieux que le vecteur contrôle HA-X. Une analyse par cytométrie en flux confirme que les cellules productrices ont été transfectées de façon équivalente par les trois plasmides pTRIP, puisque 60% d'entre elles expriment l'étiquette HA. Il semblerait donc que la surexpression de Daxx dans les cellules productrices ne gêne pas la production de particules virales, mais que les particules produites soient moins infectieuses que les particules contrôles. Ces observations laissent penser que Daxx pourrait avoir un autre rôle antiviral, indépendant de sa région SIM.

B. Incorporation de Daxx dans les particules virales

Compte tenu des résultats précédents, nous nous sommes demandés si Daxx pouvait être encapsidé dans les particules virales. En outre, un article paru en 2009 montre que HDAC1, un partenaire connu de Daxx, est susceptible d'être incorporé (Sorin et al. 2009).

Pour vérifier si Daxx était également encapsidé, des particules virales issues d'une production de lentivecteurs VIH-1 pseudotypés VSV-G ultraconcentrés ont été lysées, et Daxx a été détecté par western blot (Figure 31-A).

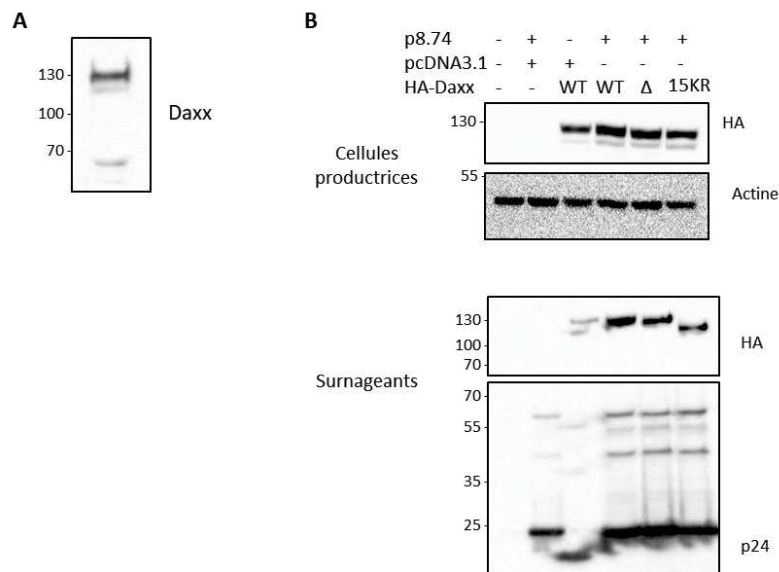


Figure 31 : Incorporation de Daxx dans les particules virales

A. Des surnageants viraux issus de la co-transfection de cellules HEK293T par les plasmides p8.74, pVSV-G, et pCSG-W ont été lysés en Laemmli, et la protéine Daxx a été détectée dans ces extraits par western blot. **B.** Des cellules HEK293T ont été co-transfectées par les plasmides indiqués, dont les formes sauvage (WT) ou mutantes (Δ pour Δ SIM et 15KR) de Daxx. 48h plus tard, les surnageants ont été récoltés et ultracentrifugés, avant d'être lysés. L'expression de l'étiquette HA et de la p24 a été détectée par western blot dans les cellules productrices ou les surnageants. L'actine sert de contrôle de charge.

Il n'est pas exclu que cette proportion de Daxx observée dans les surnageants viraux provienne de la sécrétion de Daxx par des exosomes produits en parallèle des particules virales. Des pseudo-particules virales ont donc été produites en co-transfectant les formes sauvages ou mutantes de Daxx avec un plasmide p8.74 uniquement, la glycoprotéine d'enveloppe du VSV n'étant en effet pas nécessaire à la sécrétion de pseudo-particules. La détection de l'étiquette HA dans les cellules productrices montre une transfection équivalente des cellules par les différents plasmides codant Daxx (Figure 31-B). En présence de Gag et Pol, une quantité plus importante de Daxx est détectée dans le surnageant des cellules productrices, ce qui suggère que Daxx est encapsidé dans les pseudo-particules produites. Ce processus semble indépendant de la SUMOylation ou du domaine SIM de Daxx, puisqu'aucune

différence majeure d'incorporation n'est observable entre la forme sauvage et les deux mutants de la protéine. Ces observations sont toutefois à confirmer. L'utilisation de différents mutants de Gag, comme le mutant P90A ou un mutant dépourvu de la région p6, pourrait nous renseigner sur la manière dont Daxx est encapsidé.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les organismes eucaryotes étant en contact constant avec des virus depuis des millions d'années, l'évolution a sélectionné une multitude de gènes codant tout un arsenal de protéines ayant une activité antivirale : les facteurs de résistance et de restriction. Certaines de ces protéines étant exprimées de manière constitutive par les cellules, elles constituent l'une des premières lignes de défenses antivirales et caractérisent l'immunité dite intrinsèque. Parmi ces facteurs antiviraux, certains, comme APOBEC3G (Peng et al. 2006), TRIM5 α (Asaoka et al. 2005; Sakuma et al. 2007), ou MxB (Aebi et al. 1989:19) voient leur expression augmentée en réponse à la production d'interféron, et peuvent alors être considérés comme des effecteurs de l'immunité innée. Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, plusieurs étapes du cycle de réplication sont ciblées par l'un de ces facteurs de restriction, la transcription inverse étant une cible privilégiée de ces protéines antivirales (Figure 12).

Au cours de travaux étudiant l'effet de PML sur l'infection par le VIH-1, des résultats contradictoires ont été rapportés. Un premier article publié en 2001 a montré que l'infection par le VIH-1 provoquait l'export de PML dans le cytoplasme, qui interférait alors avec l'une des étapes précoces du cycle de réplication (Turelli et al. 2001). De même, en utilisant une stratégie d'interférence par ARN dans une lignée cellulaire humaine de fibroblastes de peau, les travaux d'une autre équipe suggéraient que PML pourrait avoir une activité antivirale en ciblant une étape précoce du cycle de réplication du VIH-1, mais également d'autres rétrovirus. Cette activité serait directement liée à PML, et non aux protéines associées aux corps nucléaires que sont Daxx ou Sp100, et dépendrait très largement du type cellulaire étudié (Kahle et al. 2015). Ces données ont toutefois été contredites par d'autres études, notamment celle publiée en 2015 par notre équipe, montrant que PML limitait l'infection de certains rétrovirus, dont le VIH-1 et la rétrotransposition de rétroéléments, par l'intermédiaire de Daxx (Dutrieux, Maarifi, et al. 2015; Masroori et al. 2017). La surexpression de Daxx provoque en effet une diminution de la réplication virale dans les lignées cellulaires testées : les MEF, cellules d'origine murine, et les HeLa. En outre, l'équipe a montré que la surexpression de Daxx dans des PBMC activées, les cellules mononuclées du sang périphérique, diminuait drastiquement la production de nouveaux virions. C'est plus précisément l'étape de transcription inverse qui se trouve ciblée par Daxx (Dutrieux, Maarifi, et al. 2015). Quelques années plus tard, une autre équipe a confirmé que PML n'avait pas d'activité de restriction contre le VIH-1 en supprimant l'expression de PML dans les cellules par la technique de ciseaux génétiques CRISPR/Cas9 ou en déplaçant chacune des isoformes de PML dans différentes lignées cellulaires (Masroori et al. 2017).

Le but de mon travail de thèse était donc d'élucider le mécanisme par lequel Daxx parvenait à inhiber cette étape clé du cycle de réplication du VIH-1. Après avoir montré que la région SIM de l'extrémité C-terminale de la protéine était nécessaire à son activité antivirale, une analyse protéomique combinées à des approches de biologie moléculaire et immunobiochimiques a permis de mettre en évidence une interaction SIM-dépendante entre Daxx, CypA, et les capsides virales entrantes. D'autres protéines cellulaires comme TRIM5 α , TRIM34, et TNPO3 composent ce complexe, qui provoque notamment la stabilisation des capsides et bloque l'étape essentielle de transcription inverse (Maillet et al. 2020).

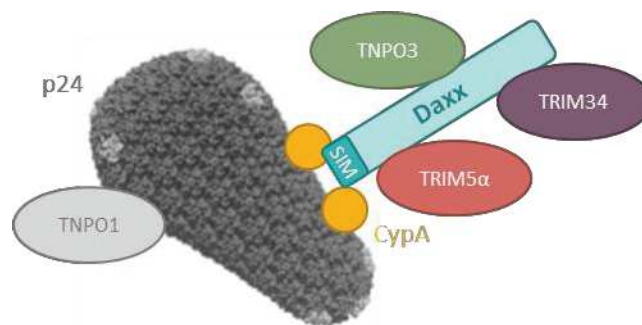


Figure 32 : Schéma du complexe multiprotéique formé par Daxx

Schéma d'un modèle dans lequel Daxx interagit avec la CypA associée aux capsides virales entrantes et recrute de nombreux partenaires comme TRIM5 α , TRIM34, ou TNPO3, constituant ainsi un complexe multiprotéique.

Rôle de la SUMOylation dans l'activité antivirale de Daxx

Comme évoqué dans l'introduction, la région SIM de Daxx et la SUMOylation de ses partenaires jouent un rôle fondamental dans la localisation et les interactions qui s'établissent entre protéines, et donc dans la régulation des différentes fonctions qui leur sont associées (Lin et al. 2006). La SUMOylation module également l'activité antivirale d'autres facteurs de restriction, comme TRIM5 α (Maarifi et al. 2018; Portilho et al. 2016) ou SAMHD1 (Martinat et al. 2020). Cependant, l'effet de cette modification post-traductionnelle sur l'activité anti-VIH-1 de Daxx n'avait pas encore été étudiée. Nous avons donc choisi d'évaluer l'effet de mutants de Daxx conduisant à la perte, soit de sa SUMOylation, soit de sa capacité à interagir avec ses partenaires SUMOylés. Dans ce contexte, la quantification des rétro-transcrits dans des cellules infectées surexprimant les formes sauvages ou mutantes de Daxx a montré que seule la forme mutante de Daxx déléetée de la région SIM ne présentait plus d'activité antivirale. Daxx étant une protéine chaperonne agissant en collaboration avec d'autres protéines, ce premier résultat suggère que Daxx exerce son activité antivirale de manière SIM-dépendante, en interagissant avec un ou plusieurs partenaires SUMOylés.

Identification de partenaires cellulaires de Daxx par spectrométrie de masse

La seconde partie de mon travail de thèse consistait donc à identifier le(s) partenaire(s) agissant en coopération avec Daxx pour inhiber l'étape de transcription inverse du cycle de réplication du virus. Une analyse de l'interactome de Daxx a donc été envisagée. Une première analyse protéomique par spectrométrie de masse *label free* a été réalisée après l'optimisation de chacune des étapes de l'expérience (Figure 22, Figure 23, Figure 24). Daxx exerçant son activité inhibitrice dans le cytoplasme des cellules infectées, ce crible a été mené sur les fractions cytoplasmiques des extraits cellulaires grâce à un fractionnement subcellulaire permettant par ailleurs de limiter la complexité des échantillons à analyser. Malgré l'identification de nombreux partenaires connus de Daxx comme PML, ATRX, ou les histones H3.3 et H4, validant ainsi la technique utilisée, ce premier crible s'est malheureusement révélé être peu informatif et n'a pas permis l'identification de protéines d'intérêt (Tableau 1). En effet, aucune des cibles variant significativement entre la condition sauvage et la condition mutante ne semblait fonctionnellement cohérente pour étayer notre hypothèse de travail. De plus, malgré la confirmation d'un fractionnement subcellulaire efficace, les quelques cibles identifiées apparaissaient majoritairement nucléaires. Si cette technique de spectrométrie de masse en *label free* présente l'avantage d'être très sensible et résolutive, une approche plus quantitative était nécessaire pour visualiser non pas une présence ou absence de partenaire(s) entre deux conditions mais plutôt un enrichissement en présence de Daxx sauvage en comparaison de la condition avec Daxx mutant, le mutant Δ SIM interagissant moins avec sa cible que la forme sauvage de Daxx.

Une deuxième stratégie permettant la collecte de données quantitatives a donc été envisagée et optimisée : la technique du SILAC (Figure 27-A). Cette technique, moins sensible que la précédente, permet cependant une analyse différentielle précise entre les conditions étudiées : pour chaque protéine, une différence d'abondance peut être quantifiée entre les échantillons à comparer. Nous avons choisi de mener cette seconde analyse sur les extraits cellulaires totaux, aux vues du nombre de protéines nucléaires identifiées dans le premier crible. En outre, sachant que la SUMOylation est un processus dynamique et réversible, un inhibiteur de désSUMOylase, l'iodoacétamide, a été ajouté aux extraits dans le but de limiter la perte d'interaction liée à la désSUMOylation rapide des protéines au moment de la lyse des cellules. Comme pour le premier crible *label free*, l'identification de partenaires connus de Daxx tels que PML (Ishov et al. 1999), HDAC1 (Li et al. 2000), ou les histones H3.3 et H4 (Elsässer et al. 2012), valide l'expérience mise en place. De plus, ce second crible a permis d'identifier des protéines impliquées dans la progression du cycle viral et connues pour interagir avec la capsid du VIH-1 comme TNPO1 (Fernandez et al. 2019), RanBP2 (Di Nunzio et al. 2012), ou TNPO3 (Valle-Casuso et al. 2012), ces candidats étant particulièrement enrichis en présence de Daxx sauvage en

comparaison de la condition mutante. Un autre partenaire bien connu de la capsid a également été identifié : la cyclophiline A (CypA). Nous avons choisi de poursuivre les recherches sur cet ensemble de candidats potentiels, même si d'autres partenaires, identifiés ou non dans les cribles, pouvaient également être impliqués dans le mécanisme que nous étudions.

D'après ces premières données, l'interaction entre Daxx et CypA est enrichie dans la condition sauvage par rapport à la condition où Daxx Δ SIM est exprimé. Ces résultats suggèrent que Daxx interagit avec la CypA par l'intermédiaire de son domaine SIM. Bien qu'à ce jour, aucune étude ne mentionne de forme SUMOylée de la protéine CypA, une analyse *in silico* suggère une certaine probabilité de SUMOylation sur le résidu lysine en position 118 (Beauclair et al. 2015) (Figure 33). On ne peut cependant pas exclure que Daxx interagit avec CypA par l'intermédiaire d'une protéine SUMOylée.

Results for putatifs SUMO site								
Position K	Sequence	Best PS	Consensus direct			Consensus Inverted		
			Type	PSd	DB Hit	Type	PSi	DB Hit
K28	GRVSFELFADKVPKTAENFRA	None	None	None	<u>1</u>	None	None	
K91	EKFEDENFILKHTGPGILSMA	None	None	None		None	None	<u>1</u>
K118	NGSQFFICTAKTEWLDGKHVV	Low	Consensus	Low	<u>1</u>	None	None	
K131	WLDGKHVVFGKVKEGMNIVEA	None	None	None	<u>1</u>	None	None	
K133	DGKHVVFGKVKEGMNIVEAME	None	None	None		None	None	<u>4</u>

Figure 33 : Etude *in silico* des potentiels sites de SUMOylation de la cyclophiline A

Etude in silico des sites de SUMOylation potentiels de la cyclophiline A par le logiciel JASSA (Joined Advanced Sumoylation Site and Sim Analyser). Séquence protéique de la CypA utilisée : Uniprot P62937

Ce candidat nous a paru particulièrement intéressant étant donné son rôle clé dans l'infection par le VIH-1, précédemment décrit dans la littérature. En effet, la CypA est impliquée dans les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1 dans plusieurs types cellulaires (Braaten et al. 1996; Braaten et Luban 2001; De Iaco et Luban 2014; Kim et al. 2019). De plus, en maintenant la structure de la capsid, CypA permet au virus d'échapper à la détection par les récepteurs intracellulaires de l'immunité, qui sont à l'origine d'une puissante production d'IFN (Rasaiyaah et al. 2013).

Validation des candidats identifiés par spectrométrie de masse

Suite au crible protéomique, l'interaction entre Daxx et les partenaires-candidats nécessitait d'être confirmée par différentes techniques habituellement utilisées dans l'étude des interactions entre protéines. J'ai donc validé et mieux caractérisé ces interactions potentielles par des expériences d'immunoprécipitation (Figure 29). Bien que TNPO1 soit un candidat intéressant étant donné sa

capacité à interagir directement avec la capsid (Fernandez et al. 2019), l'interaction entre Daxx et TNPO1 identifiée par spectrométrie de masse n'a pas été confirmée par nos expériences d'immunoprécipitation. Une récente étude, menée dans notre équipe, a suggéré que TNPO1 déplacerait la CypA pour déstabiliser la cage de capsid au niveau du pore nucléaire, favorisant ainsi le transport du PIC dans le noyau et une infection efficace (Fernandez et al. 2019). Le modèle proposé suggère donc un mécanisme différent de celui que nous cherchons à élucider.

Les résultats obtenus montrent que Daxx se trouve au sein d'un complexe multiprotéique incluant CypA, TNPO3, TRIM5 α , et TRIM34, et que Daxx interagit avec CypA de manière SIM-dépendante (Maillet et al. 2020). L'interaction de la région SIM de Daxx avec la CypA liée aux capsides entrantes permettrait ainsi le recrutement d'autres facteurs cellulaires et la formation du complexe à proximité des capsides. La perte de la région SIM de Daxx empêcherait ce dernier d'interagir avec la CypA associée aux capsides entrantes, ce qui expliquerait que le mutant Δ SIM soit dépourvu d'activité antivirale. De plus, avec le mutant de capsid P90A incapable d'interagir avec la CypA, les composants du complexe se retrouvent moins associés aux cores viraux dans les expériences de *fate of capsid assay* présentées, ce qui indique que la CypA joue un rôle central dans la formation de ce complexe. Ces résultats confirment et complètent ceux obtenus par d'autres équipes (Ohainle et al. 2020).

En effet, une étude très récente menée dans des THP-1 et basée sur la technique de délétion de gène par CRISPR-Cas9, cherchait à identifier des ISG dont la perte restaurait l'infection par le VIH-1 (Ohainle et al. 2020). Parmi les gènes identifiés, en plus de ceux impliqués dans la voie de signalisation de l'interféron ou codant des facteurs antiviraux connus comme MxB ou TRIM5 α , ce crible a révélé que Daxx était l'un des ISG permettant à la cellule d'inhiber la réplication du VIH-1. De façon assez surprenante, Daxx n'était plus identifié lorsque le crible était réalisé avec un virus portant la mutation P90A, suggérant que dans ces conditions, Daxx perdrait son activité antivirale. Ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle Daxx cible les capsides virales entrantes par l'intermédiaire de la CypA associée à ces capsides. Cependant, la dynamique de formation de ce complexe multiprotéique mérite d'être précisée.

Pour affiner la caractérisation de ce complexe multiprotéique, plusieurs expériences complémentaires seraient nécessaires. Par exemple, la surexpression de la forme sauvage ou Δ SIM de Daxx dans des cellules déplétées de chacune des autres protéines composant le complexe permettrait de différencier les protéines qui sont indispensables à l'inhibition de la transcription inverse médiée par Daxx, de celles qui ne le sont pas, après quantification des rétro-transcrits. Dans des conditions similaires, des expériences de *fate of capsid assay* ou d'immunoprécipitation nous indiqueraient quelles sont les

protéines du complexe qui sont impliquées dans la stabilisation de la capsidie ou la formation du complexe multiprotéique, respectivement. Par ailleurs, des expériences menées *in vitro* grâce à l'utilisation de protéines recombinantes, comme la résonance plasmonique de surface (SPR), nous aideraient à déterminer si les interactions observées sont directes ou si elles s'établissent par un intermédiaire. Pour détailler le rôle de la CypA dans l'activité antivirale exercée par Daxx, nous disposons dans le laboratoire de plusieurs outils biologiques et moléculaires habituellement utilisés pour explorer l'impact de l'interaction entre CypA et la capsidie : le Debio-025 (ou alisporivir), un inhibiteur pharmacologique de la CypA, et des constructions plasmidiques permettant la production de vecteurs dont la capsidie porte la mutation P90A. Il serait intéressant d'utiliser ces outils dans des cellules déplétées de la protéine Daxx, ou au contraire dans des cellules surexprimant les formes sauvages ou mutantes Δ SIM de Daxx, afin de confirmer l'implication de la CypA dans l'inhibition de la transcription inverse et de la décapsidation médiée par Daxx. Pour préciser le rôle de la SUMOylation dans l'interaction entre Daxx et la CypA, la mutation de la lysine potentiellement SUMOylable identifiée *in silico* en position 118 de la CypA pourrait être générée par mutagenèse dirigée. L'utilisation de cette forme mutée de CypA permettrait de montrer d'une part que cette protéine est effectivement SUMOylée, et d'autre part que son interaction avec Daxx dépend de sa SUMOylation. En outre, l'utilisation de la microscopie confocale en fluorescence pourrait nous renseigner sur la localisation des interactions que nous avons mises en évidence par immunoprécipitation. Le complexe étant multi-protéique, un co-marquage de toutes les protéines identifiées est techniquement compliqué à mettre en œuvre. En revanche, certains outils pourraient faciliter cette étude. Il est par exemple possible de produire des virus ou des lentivecteurs dont la CypA incorporée est couplée au fluorochrome DsRed (Francis et al. 2016), ou dont la protéine virale accessoire Vpr est couplée à la GFP (Muthumani et al. 2000). Ces outils permettraient d'utiliser d'autres anticorps pour marquer les différentes protéines du complexe, ou de limiter les problèmes de compatibilité liés aux anticorps. La technique de Duolink® permet également d'évaluer la proximité qu'il peut y avoir entre deux protéines associées.

Si la plupart des partenaires cellulaires de Daxx ont été identifiés dans le crible SILAC, la détection de protéines virales reste limitée dans ce type d'approche, à cause de leur présence en faible quantité dans les différents échantillons. De plus, les lentivecteurs utilisés pour la transduction des cellules n'ayant pas été produits par des cellules cultivées en milieu SILAC, aucune protéine virale marquée ne pouvait être incorporée dans les particules virales pendant leur production. Il aurait donc été impossible de déterminer de quel échantillon les protéines virales identifiées étaient issues, l'ensemble des conditions étant mélangé avant une analyse SILAC. Une approche biochimique plus classique a donc été employée pour étudier les interactions entre Daxx et les protéines virales.

Les partenaires viraux

Dans l'article publié par l'équipe en 2015 (Dutrieux, Maarifi, et al. 2015), des résultats de microscopie confocale en fluorescence et de Duolink® montrent une colocalisation et une proximité entre Daxx et la capsid des particules virales entrantes dans le cytoplasme des cellules infectées. Les expériences d'immunoprécipitation décrites dans le manuscrit confirment l'existence d'une interaction entre Daxx et la capsid du VIH-1, interaction qui dépend de CypA et de la région SIM de Daxx.

Deux protéines du VIH-1 ont été décrites comme étant SUMOylées : l'intégrase et la protéine p6 (Gurer et al. 2005; Zamborlini et al. 2011). Différents articles ont montré que Daxx pouvait interagir avec des intégrases virales (J. Chen et al. 2006; Greger et al. 2005), dont l'intégrase du VIH-1 (Huang et al. 2008), interaction provoquant l'inhibition de l'expression du provirus intégré. Même si cette observation reste particulièrement intéressante, l'objectif de ma thèse était de caractériser le mécanisme d'inhibition de la rétro-transcription du VIH-1 par Daxx, une étape en amont de l'intégration ou la transcription du génome viral. L'étude de l'interaction entre Daxx et l'intégrase du VIH-1 pourrait faire l'objet de futures recherches. Par ailleurs, l'article montrant la SUMOylation de p6 suggérait également une interaction entre Daxx et la forme SUMOylée de p6, par crible double hybride (Gurer et al. 2005). J'ai pu confirmer cette interaction entre les formes sauvages de Daxx et p6 par immunoprécipitation au cours de ma thèse (Figure 29-D). D'autres expériences d'immunoprécipitation étudiant l'impact des mutants Δ SIM de Daxx, ou K27R de p6, une forme non SUMOylable, dans l'interaction entre ces deux protéines permettraient d'approfondir la caractérisation de cette interaction. La protéine virale p6 intervient au cours des étapes tardives du cycle de réplication en recrutant la machinerie cellulaire ESCRT, impliquée dans le bourgeonnement et la libération des nouvelles particules virales (Garrus et al. 2001; Strack et al. 2003). Il semble donc peu probable que cette interaction intervienne au cours de la transcription inverse, étape ciblée par nos recherches. Cette association pourrait en revanche être impliquée dans l'incorporation de Daxx au sein des particules virales, observation qui sera discutée dans le paragraphe discutant de cette observation.

Stabilisation de la capsid du VIH-1 par Daxx

L'étape de transcription inverse étant étroitement liée à celle de décapsidation (Hulme et al. 2011; Rankovic et al. 2017; Yang et al. 2013), la perturbation de l'une de ces étapes peut avoir d'importantes conséquences sur la progression du cycle de réplication viral et la production de particules qui en

découle. C'est par exemple le mécanisme d'action du facteur de restriction TRIM5 α , qui inhibe la transcription inverse en déstabilisant précocement la capsid du VIH-1 (Stremlau et al. 2006). D'autre part, suivant le type cellulaire étudié et la concentration en CypA de la cellule, cette protéine est connue pour moduler la stabilité de la capsid (Li et al. 2009; Liu et al. 2016; Shah et al. 2013). Sachant que Daxx interagit avec la capsid et/ou la CypA d'une part, et qu'il inhibe la transcription inverse d'autre part, nous nous sommes intéressés à l'effet de Daxx sur la stabilité de la capsid. La technique de *fate of capsid assay* (Yang et al. 2014) permet de suivre la stabilité des cores viraux en séparant les monomères de capsid des cores stables par ultracentrifugation. J'ai montré que la forme sauvage de Daxx pouvait stabiliser les capsides du VIH-1, une observation synonyme d'inhibition de la décapsidation. En effet, plusieurs études ayant démontré qu'une sur-stabilisation de la capsid provoquée par exemple par la mutation de certains résidus de la capsid induisait une inhibition de la transcription inverse (Forshey et al. 2002; Hulme et al. 2011), il est possible que Daxx exerce son activité antivirale sur le VIH-1 par ce mécanisme. De plus, ce phénotype étant perdu avec le mutant Δ SIM, ces nouveaux résultats confirment la dépendance de Daxx vis-à-vis de la SUMOylation des partenaires qu'il recrute pour assurer sa fonction antivirale. La transcription inverse étant étroitement liée à la décapsidation, l'étude de ces événements peut se révéler compliquée.

En outre, diverses techniques permettant l'étude de l'intégrité de la capsid pourraient compléter ces observations. Des tests de décapsidation *in vitro* peuvent être réalisés à l'aide de capsides intègres isolées à partir de surnageants viraux, et dont l'enveloppe virale aura été détruite au préalable par un traitement au détergent, puis mises en contact avec des lysats issus de cellules surexprimant les différentes formes de Daxx (Shah et Aiken 2011). De plus, l'observation par microscopie à force atomique de ces cores assemblés *in vitro* en contact avec la protéine Daxx recombinante, nous indiquerait si l'effet stabilisateur de Daxx sur la capsid est direct ou non. Cette technique a d'ailleurs déjà été utilisée dans l'équipe pour montrer que TNPO1 provoque la décapsidation du VIH-1 par une interaction directe entre TNPO1 et la capsid (Fernandez et al. 2019). La stabilité des capsides peut également être suivie par microscopie à fluorescence grâce à la construction de virus composés d'une part d'intégrase couplée à la GFP, et incorporant d'autre part de la CypA couplée au DsRed. Une colocalisation GFP-DsRed est observée à la suite de l'entrée du virus dans la cellule, puis la diminution du signal DsRed traduit le désassemblage de la capsid (Francis et al. 2016; Francis et Melikyan 2018). La colocalisation GFP-DsRed pourrait être suivie en temps réel par microscopie confocale à fluorescence dans des cellules surexprimant les formes sauvages ou mutantes Δ SIM de Daxx. Les différentes techniques mentionnées ci-dessus évaluent la stabilité de la totalité des capsides. Toutefois, seule une faible proportion des virus pénétrant dans une cellule est réellement infectieuse (Thomas, Ott, et Gorelick 2007).

Ce type d'analyses pourrait confirmer la stabilisation de la capsid induite par Daxx, observée ici par la technique de *fate of capsid assay* uniquement.

Inhibition d'autres rétrovirus : un autre mécanisme ?

Daxx exerce une activité de restriction contre le VIH-1, mais également contre d'autres rétrovirus comme VIS ou MLV, et contre la rétrotransposition de certains éléments mobiles comme IAP ou MusD (Dutrieux, Maarifi, et al. 2015). Les résultats issus de mes travaux de thèse suggèrent que Daxx interagit avec au moins un partenaire SUMOylé par l'intermédiaire de sa région SIM, ce qui provoque le recrutement d'autres protéines et la formation d'un complexe contenant entre autres TRIM5 α , TRM34 et CypA. La constitution de ce complexe à proximité des particules virales entrantes est à l'origine d'une stabilisation de la capsid et d'une inhibition de la transcription inverse du VIH-1. Mais le mécanisme que nous proposons ici ne permet pas d'expliquer cette activité pléiotrope, puisque la CypA ne se lie ni à la capsid du VISmac, ni à celle de MLV (D. Braaten et al. 1996). Il semblerait donc que Daxx exerce une activité antivirale par un autre mécanisme qu'il reste à élucider pour inhiber la réplication de ces autres rétrovirus et rétrotransposons. Dans ce contexte, TRIM5 α , présent au sein du complexe multiprotéique que nous avons mis en évidence, pourrait intervenir en collaboration avec Daxx, étant donné que TRIM5 α a un rôle antiviral contre un large spectre de rétrovirus, notamment contre VISmac et N-MLV (Stremlau et al. 2004; Yap et al. 2004), mais également contre certains rétrotransposons comme LINE-1 (Volkman et al. 2020).

Incorporation de Daxx dans les particules virales

Les études présentées dans ce manuscrit ont été réalisées dans des lignées cellulaires, transduites par des vecteurs VIH-1 pseudotypés VSV-G. Des analyses complémentaires menées dans des conditions plus physiologiques seraient nécessaires pour confirmer le modèle que nous proposons. Des expériences similaires d'immunoprécipitation et de *fate of capsid assay* pourraient être réalisées dans des lignées lymphocytaires comme les Jurkat ou les CEM, les lymphocytes T étant les cibles naturelles de l'infection par le VIH-1, ou des lignées myélomonocytaires comme les THP-1. En effet, un article montre que la SUMOylation de TRIM5 α lui confère une activité différentielle selon le type cellulaire utilisé (Portilho et al. 2016). Différentes techniques de surexpression de Daxx pourraient être testées et optimisées dans ces cellules, comme la nucléofection de plasmides ou la transduction par des lentivecteurs d'expression. Une fois les techniques de surexpression mises au point, certaines expériences, comme l'étude de l'inhibition de la rétro-transcription ou la stabilité de la capsid

pourraient être répétées dans des cellules primaires, comme les LT-CD4+ activées, issus du sang de patients sains. Ce type de modèle cellulaire relevant permettrait, en outre, de réaliser des infections par des virus sauvages au lieu de transduction par des lentivecteurs pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du VSV.

Dans le but de transduire des lignées cellulaires de type Jurkat ou THP-1 pour surexprimer Daxx, j'ai entrepris de cloner la forme sauvage et la forme mutante Δ SIM de Daxx dans des lentivecteurs d'expression (Figure 30-A). Même si la quantité de particules virales libérées dans le surnageant est la même dans les différentes conditions, les particules libérées par les cellules surexprimant Daxx sont cent fois moins infectieuses que les particules produites dans des cellules transfectées par un plasmide contrôle (Figure 30-B). Des observations similaires ont été faites dans le cadre de travaux étudiant le rôle de la CypA incorporée dans des particules virales au cours des étapes précoces de l'infection par le VIH-1 (Braaten et al. 1996). En effet, les particules virales produites dans des cellules où l'association entre la capsid et la CypA est abrogée pharmacologiquement ou génétiquement ne présentent aucun défaut de morphologie, et la quantité de particules libérées dans le surnageant par les cellules traitées ou non est la même. En revanche, les virions présentent une forte diminution d'infectivité, liée à une diminution de la synthèse d'ADN viral au cours de l'infection suivante (Braaten et al. 1996). Par ailleurs, des virus produits dans des Jurkat déplétées de CypA présentent également un défaut d'infectivité, bien que les particules virales produites ne présentent aucun défaut de morphologie (Braaten et Luban 2001; Sapphire, Bobardt, et Gallay 2002). C'est un phénotype semblable à celui que l'on observe lorsque les cellules productrices surexpriment Daxx. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour tenter de comprendre quelle pourrait être l'origine de ce défaut d'infectivité.

En outre, sachant que Daxx a la possibilité d'interagir avec des protéines virales comme l'IN ou p6, et des protéines cellulaires encapsidées, comme la CypA, il se pourrait que Daxx soit lui-même incorporé dans les particules virales lors de leur production et leur libération. Cette hypothèse a été testée et nous avons pu constater la présence de Daxx dans les surnageants viraux.

Des expériences similaires pourraient être répétées, en utilisant un mutant de *gag* dépourvu de la région p6, ou un mutant de *pol* délété de la région codant l'intégrase pour savoir si l'une de ces deux protéines est impliquées dans l'incorporation de Daxx au sein des particules virales. Pour déterminer si la CypA joue un rôle dans l'incorporation, des productions virales pourraient être réalisées dans des cellules préalablement déléetées de CypA. Après avoir confirmé l'encapsidation de Daxx, il resterait à déterminer si cette fraction incorporée exerce un quelconque rôle au cours du cycle de réplication viral, qu'il soit inhibiteur ou facilitateur. Pour cela, des cellules dépourvues de protéine Daxx pourraient être infectées, et le déroulement du cycle pourrait être suivi en quantifiant les rétro-transcrits pour

mesurer la transcription inverse, les cercles à 2LTR pour mesurer l'import nucléaire, ou la production de nouvelles particules virales en quantifiant la p24 dans les surnageants viraux.

CONCLUSION

CONCLUSION

Daxx est un facteur de résistance connu pour exercer une activité antivirale contre un large spectre de virus (Maillet et Nisole 2016). L'objectif de ma thèse était d'élucider le mécanisme par lequel Daxx inhibe la transcription inverse du VIH-1 spécifiquement. Les résultats présentés ici ont d'abord montré que cette activité dépendait de la région SIM positionnée à l'extrémité C-terminale de Daxx. Ce facteur étant une protéine chaperonne sans activité enzymatique connue, ces données suggéraient une interaction entre Daxx et une protéine SUMOylée. Par l'étude de l'interactome de Daxx, nous avons montré que Daxx se lie à la CypA des capsides virales entrantes de manière SIM-dépendante, de façon à former un complexe multiprotéique constitué de TRIM5 α , TRIM34, et TNPO3. Daxx retarde alors la décapsidation et induit une inhibition de la transcription inverse. Cette étude propose un nouveau mécanisme jusqu'alors inconnu dans lequel Daxx joue un rôle antiviral. Ces travaux illustrent également le fait que la transcription inverse et la décapsidation sont deux processus interdépendants, et que l'équilibre qui existe entre ces deux processus doit être finement régulé, au risque de perturber la réplication virale. Toutefois, le mécanisme que nous avons mis en évidence n'explique pas à lui tout seul l'ensemble des fonctions antivirales de Daxx, et une meilleure compréhension de la régulation de ces phénomènes permettrait la mise au point de nouvelles stratégies de lutte efficaces contre le VIH-1.

En effet, la fonction cellulaire principale de Daxx reste la répression transcriptionnelle. C'est d'ailleurs par cette activité qu'il exerce son rôle antiviral contre un large spectre de virus à ADN (Maillet et Nisole 2016). Il a été montré que Daxx pouvait interagir avec l'intégrase du VIH-1, provoquant ainsi la répression de l'expression des gènes viraux par l'intermédiaire du recrutement d'histones déacétylases (Huang et al. 2008). C'est également par un mécanisme semblable que Daxx réprime la transcription du génome du rétrovirus ASV (Greger et al. 2005). En outre, un article montre qu'une association de PML, un partenaire connu de Daxx, avec le provirus intégré provoque sa répression transcriptionnelle (Lusic et al. 2013). Ces données ont été par la suite confirmées par d'autres travaux montrant que certaines isoformes de PML avaient la capacité de réprimer la transcription de lentivirus (Masroori et al. 2016). Ainsi, en interagissant avec les histones déacétylases, Daxx pourrait induire des modifications épigénétiques au niveau du provirus afin de réprimer la transcription des gènes viraux, participant alors à la mise en place ou au maintien de la latence du VIH-1. En s'intégrant à la chromatine de la cellule-hôte, le VIH persiste dans différents types cellulaires dispersés à travers l'organisme, jusqu'à établir une infection latente. Dans ce contexte, le provirus latent est transcriptionnellement inactif, ce qui lui permet d'échapper à la détection par les cellules de l'immunité. Malgré une efficacité certaine

des traitements aujourd'hui disponibles aboutissant à un contrôle de la charge virale chez les patients infectés et traités, la persistance de réservoirs de provirus latents constitue un obstacle majeur à la guérison complète. L'une des stratégies envisagées dans l'optique d'une clairance virale totale est celle du « shock and kill ». Cette approche consiste à réactiver le provirus latent afin que les cellules infectées soit détectées puis détruites par l'organisme (Deeks 2012). L'identification de molécules regroupées sous le nom de LRA (Latency-reversing agents) et provoquant une réactivation transcriptionnelle efficace du génome viral latent fait l'objet d'une recherche intensive dans le cadre du développement de thérapies curatives. Parmi ces molécules, les inhibiteurs d'histones déacétylases, constituent un champ de recherche prometteur, puisque l'inhibition de ces protéines semble favoriser un rebond rapide du virus au sein de l'organisme (Rasmussen et al. 2014; Søggaard et al. 2015), même si ce traitement seul ne suffit pas à éradiquer l'ensemble des réservoirs viraux (Hashemi et Sadowski 2020). Daxx étant un partenaire privilégié de ces histones déacétylases et d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, il pourrait constituer une cible intéressante pour le développement de molécules thérapeutiques visant à empêcher la latence du VIH-1. La détection et la destruction des réservoirs de latence demeurent un enjeu majeur dans la guérison des patients et dans le contrôle de la pandémie qui continue de progresser chaque année.

Même si ces données ouvrent de nouveaux horizons sur le rôle que Daxx pourrait avoir dans la mise en place et le maintien de la latence, les travaux menés pendant ma thèse ont permis de mettre en évidence de nouvelles interactions entre Daxx, la capsid virale, CypA, mais également TRIM5 α et TRIM34. Ce complexe multiprotéique influence la stabilité de la capsid du VIH-1 et interfère avec la transcription inverse. Si ce type de mécanisme était connu pour d'autres protéines cellulaires, il n'avait cependant jamais été associé à Daxx jusqu'à maintenant. Ces nouvelles données complètent l'ensemble des connaissances sur la biologie du virus, afin de mieux le combattre.

REFERENCES

REFERENCES

- Aebi, M., J. Fäh, N. Hurt, C. E. Samuel, D. Thomis, L. Bazzigher, J. Pavlovic, O. Haller, et P. Staeheli. 1989. « CDNA Structures and Regulation of Two Interferon-Induced Human Mx Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 9(11):5062-72. doi: 10.1128/mcb.9.11.5062.
- Antonucci, Jenna M., Corine St Gelais, Suresh de Silva, Jacob S. Yount, Chenxiang Tang, Xiaoyun Ji, Caitlin Shepard, Yong Xiong, Baek Kim, et Li Wu. 2016. « SAMHD1-Mediated HIV-1 Restriction in Cells Does Not Involve Ribonuclease Activity ». *Nature Medicine* 22(10):1072-74. doi: 10.1038/nm.4163.
- Arhel, Nathalie, Auguste Genovesio, Kyeong-Ae Kim, Sarah Miko, Emmanuelle Perret, Jean-Christophe Olivo-Marin, Spencer Shorte, et Pierre Charneau. 2006. « Quantitative Four-Dimensional Tracking of Cytoplasmic and Nuclear HIV-1 Complexes ». *Nature Methods* 3(10):817-24. doi: 10.1038/nmeth928.
- Arhel, Nathalie J., Sylvie Souquere-Besse, Sandie Munier, Philippe Souque, Stéphanie Guadagnini, Sandra Rutherford, Marie-Christine Prévost, Terry D. Allen, et Pierre Charneau. 2007. « HIV-1 DNA Flap Formation Promotes Uncoating of the Pre-Integration Complex at the Nuclear Pore ». *The EMBO Journal* 26(12):3025-37. doi: 10.1038/sj.emboj.7601740.
- Arriagada, Gloria, Lucia N. Muntean, et Stephen P. Goff. 2011. « SUMO-Interacting Motifs of Human TRIM5 α Are Important for Antiviral Activity ». *PLoS Pathogens* 7(4):e1002019. doi: 10.1371/journal.ppat.1002019.
- Asaoka, Kentaro, Kazuhiro Ikeda, Toshiki Hishinuma, Kuniko Horie-Inoue, Satoru Takeda, et Satoshi Inoue. 2005. « A Retrovirus Restriction Factor TRIM5 α Is Transcriptionally Regulated by Interferons ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(4):1950-56. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.173.
- Avettand-Fènoël, Véronique, Laurent Hocqueloux, Jade Ghosn, Antoine Cheret, Pierre Frange, Adeline Melard, Jean-Paul Viard, et Christine Rouzioux. 2016. « Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications ». *Clinical Microbiology Reviews* 29(4):859-80. doi: 10.1128/CMR.00015-16.
- Ayoub, Ahidjo, Chantal Akoua-Koffi, Sébastien Calvignac-Spencer, Amandine Esteban, Sabrina Locatelli, Hui Li, Yingying Li, Beatrice H. Hahn, Eric Delaporte, Fabian H. Leendertz, et Martine Peeters. 2013. « Evidence for Continuing Cross-Species Transmission of SIVsmm to Humans: Characterization of a New HIV-2 Lineage in Rural Côte d'Ivoire ». *AIDS* 27(15):2488-2491. doi: 10.1097/01.aids.0000432443.22684.50.
- Bailey, Daniel, et Peter O'Hare. 2004. « Characterization of the Localization and Proteolytic Activity of the SUMO-Specific Protease, SENP1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(1):692-703. doi: 10.1074/jbc.M306195200.

- Baldauf, Hanna-Mari, Xiaoyu Pan, Elina Erikson, Sarah Schmidt, Waaqo Daddacha, Manja Burggraf, Kristina Schenkova, Ina Ambiel, Guido Wabnitz, Thomas Gramberg, Sylvia Panitz, Egbert Flory, Nathaniel R. Landau, Serkan Sertel, Frank Rutsch, Felix Lasitschka, Baek Kim, Renate König, Oliver T. Fackler, et Oliver T. Keppeler. 2012. « SAMHD1 Restricts HIV-1 Infection in Resting CD4(+) T Cells ». *Nature Medicine* 18(11):1682-87. doi: 10.1038/nm.2964.
- Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daugey, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, et L. Montagnier. 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science (New York, N.Y.)* 220(4599):868-71. doi: 10.1126/science.6189183.
- Bayer, Peter, Andreas Arndt, Susanne Metzger, Rohit Mahajan, Frauke Melchior, Rainer Jaenicke, et Jörg Becker. 1998. « Structure Determination of the Small Ubiquitin-Related Modifier SUMO-1 ». *Journal of Molecular Biology* 280(2):275-86. doi: 10.1006/jmbi.1998.1839.
- Beauclair, Guillaume, Antoine Bridier-Nahmias, Jean-François Zagury, Ali Saïb, et Alessia Zamborlini. 2015. « JASSA: A Comprehensive Tool for Prediction of SUMOylation Sites and SIMs ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 31(21):3483-91. doi: 10.1093/bioinformatics/btv403.
- Beignon, Anne-Sophie, Kelli McKenna, Mojca Skoberne, Olivier Manches, Ida DaSilva, Daniel G. Kavanagh, Marie Larsson, Robert J. Gorelick, Jeffrey D. Lifson, et Nina Bhardwaj. 2005. « Endocytosis of HIV-1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells via Toll-like Receptor-Viral RNA Interactions ». *The Journal of Clinical Investigation* 115(11):3265-75. doi: 10.1172/JCI26032.
- Beloglazova, Natalia, Robert Flick, Anatoli Tchigvintsev, Greg Brown, Ana Popovic, Boguslaw Nocek, et Alexander F. Yakunin. 2013. « Nuclease Activity of the Human SAMHD1 Protein Implicated in the Aicardi-Goutieres Syndrome and HIV-1 Restriction ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(12):8101-10. doi: 10.1074/jbc.M112.431148.
- Bernardi, Rosa, et Pier Paolo Pandolfi. 2003. « Role of PML and the PML-Nuclear Body in the Control of Programmed Cell Death ». *Oncogene* 22(56):9048-57. doi: 10.1038/sj.onc.1207106.
- Bernardi, Rosa, et Pier Paolo Pandolfi. 2007. « Structure, Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8(12):1006-16. doi: 10.1038/nrm2277.
- Best, Jennifer L., Soula Ganiatsas, Sadhana Agarwal, Austin Changou, Paolo Salomoni, Orian Shirihai, Pamela B. Meluh, Pier Paolo Pandolfi, et Leonard I. Zon. 2002. « SUMO-1 Protease-1 Regulates Gene Transcription through PML ». *Molecular Cell* 10(4):843-55. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00699-8.
- Bhattacharya, Akash, Steven L. Alam, Thomas Fricke, Kaneil Zadrozny, Jaroslaw Sedzicki, Alexander B. Taylor, Borries Demeler, Owen Pornillos, Barbie K. Ganser-Pornillos, Felipe Diaz-Griffero, Dmitri N. Ivanov, et Mark Yeager. 2014. « Structural Basis of HIV-1 Capsid Recognition by PF74 and CPSF6 ».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111(52):18625-30. doi: 10.1073/pnas.1419945112.

Bieniasz, Paul D. 2004. « Intrinsic Immunity: A Front-Line Defense against Viral Attack ». *Nature Immunology* 5(11):1109-15. doi: 10.1038/ni1125.

Black, Lesa R., et Christopher Aiken. 2010. « TRIM5alpha Disrupts the Structure of Assembled HIV-1 Capsid Complexes in Vitro ». *Journal of Virology* 84(13):6564-69. doi: 10.1128/JVI.00210-10.

Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon, et P. S. Freemont. 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* 13(5):971-82.

Bohren, Kurt M., Varsha Nadkarni, Jian H. Song, Kenneth H. Gabbay, et David Owerbach. 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(26):27233-38. doi: 10.1074/jbc.M402273200.

Braaten, D., E. K. Franke, et J. Luban. 1996. « Cyclophilin A Is Required for the Replication of Group M Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Simian Immunodeficiency Virus SIV(CPZ)GAB but Not Group O HIV-1 or Other Primate Immunodeficiency Viruses ». *Journal of Virology* 70(7):4220-27.

Braaten, D., et J. Luban. 2001. « Cyclophilin A Regulates HIV-1 Infectivity, as Demonstrated by Gene Targeting in Human T Cells ». *The EMBO Journal* 20(6):1300-1309. doi: 10.1093/emboj/20.6.1300.

Braaten, E. K. Franke, et J. Luban. 1996. « Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. » *Journal of Virology* 70(6):3551-60.

Brass, Abraham L., I. Chueh Huang, Yair Benita, Sinu P. John, Manoj N. Krishnan, Eric M. Feeley, Bethany J. Ryan, Jessica L. Weyer, Louise van der Weyden, Erol Fikrig, David J. Adams, Ramnik J. Xavier, Michael Farzan, et Stephen J. Elledge. 2009. « The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus ». *Cell* 139(7):1243-54. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.017.

Briggs, John A. G., et Hans-Georg Kräusslich. 2011. « The Molecular Architecture of HIV ». *Journal of Molecular Biology* 410(4):491-500. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.021.

Buffone, Cindy, Bianca Schulte, Silvana Opp, et Felipe Diaz-Griffero. 2015. « Contribution of MxB Oligomerization to HIV-1 Capsid Binding and Restriction ». *Journal of Virology* 89(6):3285-94. doi: 10.1128/JVI.03730-14.

Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, et M. Stevenson. 1992. « Active Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(14):6580-84. doi: 10.1073/pnas.89.14.6580.

- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, et M. Stevenson. 1993. « Association of Integrase, Matrix, and Reverse Transcriptase Antigens of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Viral Nucleic Acids Following Acute Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(13):6125-29. doi: 10.1073/pnas.90.13.6125.
- Burdick, Ryan C., Chenglei Li, MohamedHusen Munshi, Jonathan M. O. Rawson, Kunio Nagashima, Wei-Shau Hu, et Vinay K. Pathak. 2020. « HIV-1 Uncoats in the Nucleus near Sites of Integration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(10):5486-93. doi: 10.1073/pnas.1920631117.
- Campbell, Edward M., Mark P. Dodding, Melvyn W. Yap, Xiaolu Wu, Sarah Gallois-Montbrun, Michael H. Malim, Jonathan P. Stoye, et Thomas J. Hope. 2007. « TRIM5 Alpha Cytoplasmic Bodies Are Highly Dynamic Structures ». *Molecular Biology of the Cell* 18(6):2102-11. doi: 10.1091/mbc.e06-12-1075.
- Campbell, Edward M., et Thomas J. Hope. 2015. « HIV-1 Capsid: The Multifaceted Key Player in HIV-1 Infection ». *Nature Reviews Microbiology* 13(8):471-83. doi: 10.1038/nrmicro3503.
- Campbell, Edward M., Jared Weingart, Paola Sette, Silvana Opp, Jaya Sastri, Sarah K. O'Connor, Sarah Talley, Felipe Diaz-Griffero, Vanessa Hirsch, et Fadila Bouamr. 2016. « TRIM5 α -Mediated Ubiquitin Chain Conjugation Is Required for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization ». *Journal of Virology* 90(4):1849-57. doi: 10.1128/JVI.01948-15.
- Carnes, Stephanie K., Jing Zhou, et Christopher Aiken. 2018. « HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus ». *Journal of Virology* 92(20). doi: 10.1128/JVI.00358-18.
- Carthagen, Laetitia, Anna Bergamaschi, Joseph M. Luna, Annie David, Pradeep D. Uchil, Florence Margottin-Goguet, Walther Mothes, Uriel Hazan, Catherine Transy, Gianfranco Pancino, et Sébastien Nisole. 2009. « Human TRIM Gene Expression in Response to Interferons ». *PloS One* 4(3):e4894. doi: 10.1371/journal.pone.0004894.
- Chang, Che-Chang, Ding-Yen Lin, Hsin-I. Fang, Ruey-Hwa Chen, et Hsiu-Ming Shih. 2005. « Daxx Mediates the Small Ubiquitin-like Modifier-Dependent Transcriptional Repression of Smad4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(11):10164-73. doi: 10.1074/jbc.M409161200.
- Chang, Che-Chang, Mandar T. Naik, Yen-Sung Huang, Jen-Chong Jeng, Pei-Hsin Liao, Hong-Yi Kuo, Chun-Chen Ho, Yung-Lin Hsieh, Chiou-Hong Lin, Nai-Jia Huang, Nandita M. Naik, Camy C. H. Kung, Shu-Yu Lin, Ruey-Hwa Chen, Kun-Sang Chang, Tai-Huang Huang, et Hsiu-Ming Shih. 2011. « Structural and Functional Roles of Daxx SIM Phosphorylation in SUMO Paralog-Selective Binding and Apoptosis Modulation ». *Molecular Cell* 42(1):62-74. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.022.
- Chang, H. Y., H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo, et D. Baltimore. 1998. « Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx ». *Science (New York, N.Y.)* 281(5384):1860-63. doi: 10.1126/science.281.5384.1860.

- Chang, Hae Ryung, Anudari Munkhjargal, Myung-Jin Kim, Seon Young Park, Eunyoung Jung, Jae-Ha Ryu, Young Yang, Jong-Seok Lim, et Yonghwan Kim. 2018. « The Functional Roles of PML Nuclear Bodies in Genome Maintenance ». *Mutation Research* 809:99-107. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002.
- Charneau, Pierre, Gilles Mirambeau, Pascal Roux, Sylvie Paulous, Henri Buc, et François Clavel. 1994. « HIV-1 Reverse Transcription A Termination Step at the Center of the Genome ». *Journal of Molecular Biology* 241(5):651-62. doi: 10.1006/jmbi.1994.1542.
- Chen, H. K., C. Y. Pai, J. Y. Huang, et N. H. Yeh. 1999. « Human Nopp140, Which Interacts with RNA Polymerase I: Implications for RRNA Gene Transcription and Nucleolar Structural Organization ». *Molecular and Cellular Biology* 19(12):8536-46. doi: 10.1128/mcb.19.12.8536.
- Chen, Jin-zhong, Chao-neng Ji, Guan-lan Xu, Rong-yan Pang, Ji-hua Yao, Huan-zhang Zhu, Jing-lun Xue, et William Jia. 2006. « DAXX Interacts with Phage PhiC31 Integrase and Inhibits Recombination ». *Nucleic Acids Research* 34(21):6298-6304. doi: 10.1093/nar/gkl890.
- Chen, Keyang, Jialing Huang, Chune Zhang, Sophia Huang, Giuseppe Nunnari, Feng-xiang Wang, Xiangrong Tong, Ling Gao, Kristi Nikisher, et Hui Zhang. 2006. « Alpha Interferon Potently Enhances the Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity of APOBEC3G in Resting Primary CD4 T Cells ». *Journal of Virology* 80(15):7645-57. doi: 10.1128/JVI.00206-06.
- Chin, Christopher R., Jill M. Perreira, George Savidis, Jocelyn M. Portmann, Aaron M. Aker, Eric M. Feeley, Miles C. Smith, et Abraham L. Brass. 2015. « Direct Visualization of HIV-1 Replication Intermediates Shows That Capsid and CPSF6 Modulate HIV-1 Intra-Nuclear Invasion and Integration ». *Cell Reports* 13(8):1717-31. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.036.
- Choi, Jongsu, Jeongmin Ryoo, Changhoon Oh, Sungyeon Hwang, et Kwangseog Ahn. 2015. « SAMHD1 Specifically Restricts Retroviruses through Its RNase Activity ». *Retrovirology* 12:46. doi: 10.1186/s12977-015-0174-4.
- Chougui, Ghina, Michael Martin, Roy Matkovic, Lucie Etienne, et Florence Margottin-Goguet. 2019. « Vpx n'a pas dit son dernier mot « HUSH » ! » *médecine/sciences* 35(1):9-12. doi: 10.1051/medsci/2018312.
- Chougui, Ghina, Soundasse Munir-Matloob, Roy Matkovic, Michaël M. Martin, Marina Morel, Hichem Lahouassa, Marjorie Leduc, Bertha Cecilia Ramirez, Lucie Etienne, et Florence Margottin-Goguet. 2018. « HIV-2/SIV Viral Protein X Counteracts HUSH Repressor Complex ». *Nature Microbiology* 3(8):891-97. doi: 10.1038/s41564-018-0179-6.
- Cingöz, Oya, et Stephen P. Goff. 2019. « HIV-1 Is a Poor Inducer of Innate Immune Responses ». *MBio* 10(1). doi: 10.1128/mBio.02834-18.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, et Et Al. 1986. « Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS ». *Science* 233(4761):343-46. doi: 10.1126/science.2425430.

- Cohen, Camille, Armelle Corpet, Simon Roubille, Mohamed Ali Maroui, Nolwenn Poccardi, Antoine Rousseau, Constance Kleijwegt, Olivier Binda, Pascale Texier, Nancy Sawtell, Marc Labetoulle, et Patrick Lomonte. 2018. « Promyelocytic Leukemia (PML) Nuclear Bodies (NBs) Induce Latent/Quiescent HSV-1 Genomes Chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis ». *PLoS Pathogens* 14(9):e1007313. doi: 10.1371/journal.ppat.1007313.
- Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, et D. Baltimore. 1998. « HIV-1 Nef Protein Protects Infected Primary Cells against Killing by Cytotoxic T Lymphocytes ». *Nature* 391(6665):397-401. doi: 10.1038/34929.
- Compton, Alex A., Timothée Bruel, Françoise Porrot, Adeline Mallet, Martin Sachse, Marine Euvrard, Chen Liang, Nicoletta Casartelli, et Olivier Schwartz. 2014. « IFITM Proteins Incorporated into HIV-1 Virions Impair Viral Fusion and Spread ». *Cell Host & Microbe* 16(6):736-47. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.001.
- Compton, Teresa, Evelyn A. Kurt-Jones, Karl W. Boehme, John Belko, Eicke Latz, Douglas T. Golenbock, et Robert W. Finberg. 2003. « Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-like Receptor 2 ». *Journal of Virology* 77(8):4588-96. doi: 10.1128/jvi.77.8.4588-4596.2003.
- Cribier, Alexandra, Benjamin Descours, Ana Luiza Chaves Valadão, Nadine Laguette, et Monsef Benkirane. 2013. « Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1 ». *Cell Reports* 3(4):1036-43. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.017.
- D'arc, Mirela, Ahidjo Ayouba, Amandine Esteban, Gerald H. Learn, Vanina Boué, Florian Liegeois, Lucie Etienne, Nikki Tagg, Fabian H. Leendertz, Christophe Boesch, Nadège F. Madinda, Martha M. Robbins, Maryke Gray, Amandine Cournil, Marcel Ooms, Michael Letko, Viviana A. Simon, Paul M. Sharp, Beatrice H. Hahn, Eric Delaporte, Eitel Mpoudi Ngole, et Martine Peeters. 2015. « Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(11):E1343-52. doi: 10.1073/pnas.1502022112.
- De Iaco, Alberto, et Jeremy Luban. 2014. « Cyclophilin A Promotes HIV-1 Reverse Transcription but Its Effect on Transduction Correlates Best with Its Effect on Nuclear Entry of Viral CDNA ». *Retrovirology* 11:11. doi: 10.1186/1742-4690-11-11.
- Deeks, Steven G. 2012. « HIV: Shock and Kill ». *Nature* 487(7408):439-40. doi: 10.1038/487439a.
- Delbarre, Erwan, Kristina Ivanauskienė, Thomas Küntziger, et Philippe Collas. 2013. « DAXX-Dependent Supply of Soluble (H3.3-H4) Dimers to PML Bodies Pending Deposition into Chromatin ». *Genome Research* 23(3):440-51. doi: 10.1101/gr.142703.112.
- DeNizio, Jamie E., Simon J. Elsässer, et Ben E. Black. 2014. « DAXX Co-Folds with H3.3/H4 Using High Local Stability Conferred by the H3.3 Variant Recognition Residues ». *Nucleic Acids Research* 42(7):4318-31. doi: 10.1093/nar/gku090.

- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et R. T. Hay. 1998. « SUMO-1 Modification of IkappaBalpha Inhibits NF-KappaB Activation ». *Molecular Cell* 2(2):233-39. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80133-1.
- Desterro, Joana M. P., Manuel S. Rodriguez, Graham D. Kemp, et Ronald T. Hay. 1999. « Identification of the Enzyme Required for Activation of the Small Ubiquitin-like Protein SUMO-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 274(15):10618-24. doi: 10.1074/jbc.274.15.10618.
- Dharan, Adarsh, Niklas Bachmann, Sarah Talley, Virginia Zwickelmaier, et Edward M. Campbell. 2020. « Nuclear Pore Blockade Reveals That HIV-1 Completes Reverse Transcription and Uncoating in the Nucleus ». *Nature Microbiology*. doi: 10.1038/s41564-020-0735-8.
- Di Nunzio, Francesca, Anne Danckaert, Thomas Fricke, Patricio Perez, Juliette Fernandez, Emmanuelle Perret, Pascal Roux, Spencer Shorte, Pierre Charneau, Felipe Diaz-Griffero, et Nathalie J. Arhel. 2012. « Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration ». *PLOS ONE* 7(9):e46037. doi: 10.1371/journal.pone.0046037.
- Di Nunzio, Francesca, Thomas Fricke, Annarita Miccio, Jose Carlos Valle-Casuso, Patricio Perez, Philippe Souque, Ermanno Rizzi, Marco Severgnini, Fulvio Mavilio, Pierre Charneau, et Felipe Diaz-Griffero. 2013. « Nup153 and Nup98 Bind the HIV-1 Core and Contribute to the Early Steps of HIV-1 Replication ». *Virology* 440(1):8-18. doi: 10.1016/j.virol.2013.02.008.
- Doyle, Tomas, Caroline Goujon, et Michael H. Malim. 2015. « HIV-1 and Interferons: Who's Interfering with Whom? » *Nature Reviews Microbiology* 13(7):403-13. doi: 10.1038/nrmicro3449.
- Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, et W. A. Paxton. 1996. « HIV-1 Entry into CD4+ Cells Is Mediated by the Chemokine Receptor CC-CKR-5 ». *Nature* 381(6584):667-73. doi: 10.1038/381667a0.
- Drané, Pascal, Khalid Ouararhni, Arnaud Depaux, Muhammad Shuaib, et Ali Hamiche. 2010. « The Death-Associated Protein DAXX Is a Novel Histone Chaperone Involved in the Replication-Independent Deposition of H3.3 ». *Genes & Development* 24(12):1253-65. doi: 10.1101/gad.566910.
- Dutrieux, Jacques, Ghizlane Maarifi, Débora M. Portilho, Nathalie J. Arhel, Mounira K. Chelbi-Alix, et Sébastien Nisole. 2015. « PML/TRIM19-Dependent Inhibition of Retroviral Reverse-Transcription by Daxx ». *PLoS Pathogens* 11(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1005280.
- Dutrieux, Jacques, Débora M. Portilho, Nathalie J. Arhel, Uriel Hazan, et Sébastien Nisole. 2015. « TRIM5 α Is a SUMO Substrate ». *Retrovirology* 12:28. doi: 10.1186/s12977-015-0155-7.
- Ecsedy, Jeffrey A., Jennifer S. Michaelson, et Philip Leder. 2003. « Homeodomain-Interacting Protein Kinase 1 Modulates Daxx Localization, Phosphorylation, and Transcriptional Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 23(3):950-60. doi: 10.1128/mcb.23.3.950-960.2003.
- Elsässer, Simon J., Hongda Huang, Peter W. Lewis, Jason W. Chin, C. David Allis, et Dinshaw J. Patel. 2012. « DAXX Envelops a Histone H3.3-H4 Dimer for H3.3-Specific Recognition ». *Nature* 491(7425):560-65. doi: 10.1038/nature11608.

- Elsässer, Simon J., Kyung-Min Noh, Nichole Diaz, C. David Allis, et Laura A. Banaszynski. 2015. « Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells ». *Nature* 522(7555):240-44. doi: 10.1038/nature14345.
- Engelman, Alan, Kiyoshi Mizuuchi, et Robert Craigie. 1991. « HIV-1 DNA Integration: Mechanism of Viral DNA Cleavage and DNA Strand Transfer ». *Cell* 67(6):1211-21. doi: 10.1016/0092-8674(91)90297-C.
- Escobar-Cabrera, Eric, Desmond K. W. Lau, Serena Giovinazzi, Alexander M. Ishov, et Lawrence P. McIntosh. 2010. « Structural Characterization of the DAXX N-Terminal Helical Bundle Domain and Its Complex with Rassf1C ». *Structure* 18(12):1642-53. doi: 10.1016/j.str.2010.09.016.
- Escobar-Cabrera, Eric, Mark Okon, Desmond K. W. Lau, Christopher F. Dart, Alexandre M. J. J. Bonvin, et Lawrence P. McIntosh. 2011. « Characterizing the N- and C-Terminal Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-Interacting Motifs of the Scaffold Protein DAXX ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(22):19816-29. doi: 10.1074/jbc.M111.231647.
- Fagioli, M., M. Alcalay, L. Tomassoni, P. F. Ferrucci, A. Mencarelli, D. Riganelli, F. Grignani, T. Pozzan, I. Nicoletti, F. Grignani, et P. G. Pelicci. 1998. « Cooperation between the RING + B1-B2 and Coiled-Coil Domains of PML Is Necessary for Its Effects on Cell Survival ». *Oncogene* 16(22):2905-13. doi: 10.1038/sj.onc.1201811.
- Faria, Nuno R., Andrew Rambaut, Marc A. Suchard, Guy Baele, Trevor Bedford, Melissa J. Ward, Andrew J. Tatem, João D. Sousa, Nimalan Arinaminpathy, Jacques Pépin, David Posada, Martine Peeters, Oliver G. Pybus, et Philippe Lemey. 2014. « The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations ». *Science (New York, N.Y.)* 346(6205):56-61. doi: 10.1126/science.1256739.
- Fassati, Ariberto, et Stephen P. Goff. 2001. « Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 ». *Journal of Virology* 75(8):3626-35. doi: 10.1128/JVI.75.8.3626-3635.2001.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, et E. A. Berger. 1996. « HIV-1 Entry Cofactor: Functional CDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 272(5263):872-77. doi: 10.1126/science.272.5263.872.
- Fernandez, Juliette, Anthony K. Machado, Sébastien Lyonnais, Célia Chamontin, Kathleen Gärtner, Thibaut Léger, Corinne Henriquet, Camille Garcia, Débora M. Portilho, Martine Pugnière, Laurent Chaloin, Delphine Muriaux, Yohei Yamauchi, Mickaël Blaise, Sébastien Nisole, et Nathalie J. Arhel. 2019. « Transportin-1 Binds to the HIV-1 Capsid via a Nuclear Localization Signal and Triggers Uncoating ». *Nature Microbiology* 4(11):1840-50. doi: 10.1038/s41564-019-0575-6.
- Fernandez, Juliette, Débora M. Portilho, Anne Danckaert, Sandie Munier, Andreas Becker, Pascal Roux, Anaba Zambo, Spencer Shorte, Yves Jacob, Pierre-Olivier Vidalain, Pierre Charneau, François Clavel, et Nathalie J. Arhel. 2015. « Microtubule-Associated Proteins 1 (MAP1) Promote Human

- Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Intracytoplasmic Routing to the Nucleus ». *The Journal of Biological Chemistry* 290(8):4631-46. doi: 10.1074/jbc.M114.613133.
- Fletcher, Adam J., Devin E. Christensen, Chad Nelson, Choon Ping Tan, Torsten Schaller, Paul J. Lehner, Wesley I. Sundquist, et Greg J. Towers. 2015. « TRIM5 α Requires Ube2W to Anchor Lys63-Linked Ubiquitin Chains and Restrict Reverse Transcription ». *The EMBO Journal* 34(15):2078-95. doi: 10.15252/embj.201490361.
- Forshey, Brett M., Uta von Schwedler, Wesley I. Sundquist, et Christopher Aiken. 2002. « Formation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core of Optimal Stability Is Crucial for Viral Replication ». *Journal of Virology* 76(11):5667-77. doi: 10.1128/jvi.76.11.5667-5677.2002.
- Francis, Ashwanth C., Mariana Marin, Jiong Shi, Christopher Aiken, et Gregory B. Melikyan. 2016. « Time-Resolved Imaging of Single HIV-1 Uncoating In Vitro and in Living Cells ». *PLoS Pathogens* 12(6):e1005709. doi: 10.1371/journal.ppat.1005709.
- Francis, Ashwanth C., et Gregory B. Melikyan. 2018. « Single HIV-1 Imaging Reveals Progression of Infection through CA-Dependent Steps of Docking at the Nuclear Pore, Uncoating, and Nuclear Transport ». *Cell Host & Microbe* 23(4):536-548.e6. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.009.
- Franke, Ettaly Kara, Hannah En Hui Yuan, et Jeremy Luban. 1994. « Specific Incorporation of Cyclophilin A into HIV-1 Virions ». *Nature* 372(6504):359-62. doi: 10.1038/372359a0.
- Frankel, Alan D., et John A. T. Young. 1998. « HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA ». *Annual Review of Biochemistry* 67(1):1-25. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.1.
- Freed, Eric O. 2015. « HIV-1 Assembly, Release and Maturation ». *Nature Reviews. Microbiology* 13(8):484-96. doi: 10.1038/nrmicro3490.
- Fukuyo, Yayoi, Tetsuya Kitamura, Masahiro Inoue, Nobuko T. Horikoshi, Ryuji Higashikubo, Clayton R. Hunt, Anny Usheva, et Nobuo Horikoshi. 2009. « Phosphorylation-Dependent Lys63-Linked Polyubiquitination of Daxx Is Essential for Sustained TNF- α -Induced ASK1 Activation ». *Cancer Research* 69(19):7512-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2148.
- Gamble, Theresa R., Felix F. Vajdos, Sanghee Yoo, David K. Worthylake, Megan Houseweart, Wesley I. Sundquist, et Christopher P. Hill. 1996. « Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid ». *Cell* 87(7):1285-94. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81823-1.
- Ganser-Pornillos, Barbie K., Viswanathan Chandrasekaran, Owen Pornillos, Joseph G. Sodroski, Wesley I. Sundquist, et Mark Yeager. 2011. « Hexagonal Assembly of a Restricting TRIM5 α Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(2):534-39. doi: 10.1073/pnas.1013426108.
- Ganser-Pornillos, Barbie K., et Owen Pornillos. 2019. « Restriction of HIV-1 and Other Retroviruses by TRIM5 ». *Nature Reviews Microbiology* 17(9):546-56. doi: 10.1038/s41579-019-0225-2.

- Gao, Daxing, Jiayi Wu, You-Tong Wu, Fenghe Du, Chukwuemika Aroh, Nan Yan, Lijun Sun, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses ». *Science (New York, N.Y.)* 341(6148):903-6. doi: 10.1126/science.1240933.
- Garcia, J. V., et A. D. Miller. 1991. « Serine Phosphorylation-Independent Downregulation of Cell-Surface CD4 by Nef ». *Nature* 350(6318):508-11. doi: 10.1038/350508a0.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Côté, R. L. Rich, D. G. Myszka, et W. I. Sundquist. 2001. « Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding ». *Cell* 107(1):55-65. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00506-2.
- Gitti, R. K., B. M. Lee, J. Walker, M. F. Summers, S. Yoo, et W. I. Sundquist. 1996. « Structure of the Amino-Terminal Core Domain of the HIV-1 Capsid Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 273(5272):231-35. doi: 10.1126/science.273.5272.231.
- Goldstone, David C., Valerie Ennis-Adeniran, Joseph J. Hedden, Harriet C. T. Groom, Gillian I. Rice, Evangelos Christodoulou, Philip A. Walker, Geoff Kelly, Lesley F. Haire, Melvyn W. Yap, Luiz Pedro S. de Carvalho, Jonathan P. Stoye, Yanick J. Crow, Ian A. Taylor, et Michelle Webb. 2011. « HIV-1 Restriction Factor SAMHD1 Is a Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase ». *Nature* 480(7377):379-82. doi: 10.1038/nature10623.
- Gong, Limin, et Edward T. H. Yeh. 2006. « Characterization of a Family of Nucleolar SUMO-Specific Proteases with Preference for SUMO-2 or SUMO-3 ». *Journal of Biological Chemistry* 281(23):15869-77. doi: 10.1074/jbc.M511658200.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, et A. Saxon. 1981. « Pneumocystis Carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency ». *The New England Journal of Medicine* 305(24):1425-31. doi: 10.1056/NEJM198112103052401.
- Göttlinger, H. G., J. G. Sodroski, et W. A. Haseltine. 1989. « Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(15):5781-85.
- Goujon, Caroline, Olivier Moncorgé, Hélène Bauby, Tomas Doyle, Christopher C. Ward, Torsten Schaller, Stéphane Hué, Wendy S. Barclay, Reiner Schulz, et Michael H. Malim. 2013. « Human MX2 Is an Interferon-Induced Post-Entry Inhibitor of HIV-1 Infection ». *Nature* 502(7472):559-62. doi: 10.1038/nature12542.
- Greger, James G., Richard A. Katz, Alexander M. Ishov, Gerd G. Maul, et Anna Marie Skalka. 2005. « The Cellular Protein Daxx Interacts with Avian Sarcoma Virus Integrase and Viral DNA to Repress Viral Transcription ». *Journal of Virology* 79(8):4610-18. doi: 10.1128/JVI.79.8.4610-4618.2005.

- Grime, John M. A., James F. Dama, Barbie K. Ganser-Pornillos, Cora L. Woodward, Grant J. Jensen, Mark Yeager, et Gregory A. Voth. 2016. « Coarse-Grained Simulation Reveals Key Features of HIV-1 Capsid Self-Assembly ». *Nature Communications* 7:11568. doi: 10.1038/ncomms11568.
- Guo, Dehuang, Manyu Li, Yan Zhang, Ping Yang, Sarah Eckenrode, Diane Hopkins, Weipeng Zheng, Sharad Purohit, Robert H. Podolsky, Andrew Muir, Jinzhao Wang, Zheng Dong, Todd Brusko, Mark Atkinson, Paolo Pozzilli, Adina Zeidler, Leslie J. Raffel, Chaim O. Jacob, Yongsoo Park, Manuel Serrano-Rios, Maria T. Martinez Larrad, Zixin Zhang, Henri-Jean Garchon, Jean-Francois Bach, Jerome I. Rotter, Jin-Xiong She, et Cong-Yi Wang. 2004. « A Functional Variant of SUMO4, a New I κ B α Modifier, Is Associated with Type 1 Diabetes ». *Nature Genetics* 36(8):837-41. doi: 10.1038/ng1391.
- Gurer, Cagan, Lionel Berthoux, et Jeremy Luban. 2005. « Covalent Modification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 P6 by SUMO-1 ». *Journal of Virology* 79(2):910-17. doi: 10.1128/JVI.79.2.910-917.2005.
- Guzman, Roberto N. De, Zheng Rong Wu, Chelsea C. Stalling, Lucia Pappalardo, Philip N. Borer, et Michael F. Summers. 1998. « Structure of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Bound to the SL3 Ψ -RNA Recognition Element ». *Science* 279(5349):384-88. doi: 10.1126/science.279.5349.384.
- Hallenberger, Sabine, Valerie Bosch, Herbert Angliker, Elliott Shaw, Hans-Dieter Klenk, et Wolfgang Garten. 1992. « Inhibition of Furin-Mediated Cleavage Activation of HIV-1 Glycoprotein Gp160 ». *Nature* 360(6402):358-61. doi: 10.1038/360358a0.
- Hamid, Faysal Bin, Jinsun Kim, et Cha-Gyun Shin. 2017. « Distribution and Fate of HIV-1 Unintegrated DNA Species: A Comprehensive Update ». *AIDS Research and Therapy* 14(1):1-8. doi: 10.1186/s12981-016-0127-6.
- Hang, Jun, et Mary Dasso. 2002. « Association of the Human SUMO-1 Protease SENP2 with the Nuclear Pore ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(22):19961-66. doi: 10.1074/jbc.M201799200.
- Hardeland, Ulrike, Roland Steinacher, Josef Jiricny, et Primo Schär. 2002. « Modification of the Human Thymine-DNA Glycosylase by Ubiquitin-like Proteins Facilitates Enzymatic Turnover ». *The EMBO Journal* 21(6):1456-64. doi: 10.1093/emboj/21.6.1456.
- Hashemi, Pargol, et Ivan Sadowski. 2020. « Diversity of Small Molecule HIV-1 Latency Reversing Agents Identified in Low- and High-throughput Small Molecule Screens ». *Medicinal Research Reviews* 40(3):881-908. doi: 10.1002/med.21638.
- Hecker, Christina-Maria, Matthias Rabiller, Kaisa Haglund, Peter Bayer, et Ivan Dikic. 2006. « Specification of SUMO1- and SUMO2-Interacting Motifs ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(23):16117-27. doi: 10.1074/jbc.M512757200.
- Hendriks, Ivo A., et Alfred C. O. Vertegaal. 2016. « A Comprehensive Compilation of SUMO Proteomics ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(9):581-95. doi: 10.1038/nrm.2016.81.

- Henrick, Bethany M., Xiao-Dan Yao, Muhammad Atif Zahoor, Alash'le Abimiku, Sophia Osawe, et Kenneth L. Rosenthal. 2019. « TLR10 Senses HIV-1 Proteins and Significantly Enhances HIV-1 Infection ». *Frontiers in Immunology* 10:482. doi: 10.3389/fimmu.2019.00482.
- Hietakangas, Ville, Julius Anckar, Henri A. Blomster, Mitsuaki Fujimoto, Jorma J. Palvimo, Akira Nakai, et Lea Sistonen. 2006. « PDSM, a Motif for Phosphorylation-Dependent SUMO Modification ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(1):45-50. doi: 10.1073/pnas.0503698102.
- Hoelper, Dominik, Hongda Huang, Aayushi Y. Jain, Dinshaw J. Patel, et Peter W. Lewis. 2017. « Structural and Mechanistic Insights into ATRX-Dependent and -Independent Functions of the Histone Chaperone DAXX ». *Nature Communications* 8(1):1193. doi: 10.1038/s41467-017-01206-y.
- Hofmann, H., S. Flöss, et T. Stamminger. 2000. « Covalent Modification of the Transactivator Protein IE2-P86 of Human Cytomegalovirus by Conjugation to the Ubiquitin-Homologous Proteins SUMO-1 and HSMT3b ». *Journal of Virology* 74(6):2510-24. doi: 10.1128/jvi.74.6.2510-2524.2000.
- Hoischen, Christian, Shamci Monajembashi, Klaus Weisshart, et Peter Hemmerich. 2018. « Multimodal Light Microscopy Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies ». *Frontiers in Oncology* 8. doi: 10.3389/fonc.2018.00125.
- Hollenbach, A. D., J. E. Sublett, C. J. McPherson, et G. Grosveld. 1999. « The Pax3-FKHR Oncoprotein Is Unresponsive to the Pax3-Associated Repressor HDaxx ». *The EMBO Journal* 18(13):3702-11. doi: 10.1093/emboj/18.13.3702.
- Hollenbach, Andrew D., Craig J. McPherson, Edwin J. Mientjes, Rekha Iyengar, et Gerard Grosveld. 2002. « Daxx and Histone Deacetylase II Associate with Chromatin through an Interaction with Core Histones and the Chromatin-Associated Protein Dek ». *Journal of Cell Science* 115(Pt 16):3319-30.
- Horváth, András, Gergely Rona, Michele Pagano, et Philip W. Jordan. 2020. « Interaction between NSMCE4A and GPS1 Links the SMC5/6 Complex to the COP9 Signalosome ». *BMC Molecular and Cell Biology* 21(1):36. doi: 10.1186/s12860-020-00278-x.
- Hrecka, Kasia, Caili Hao, Magda Gierszewska, Selene K. Swanson, Malgorzata Kesik-Brodacka, Smita Srivastava, Laurence Florens, Michael P. Washburn, et Jacek Skowronski. 2011. « Vpx Relieves Inhibition of HIV-1 Infection of Macrophages Mediated by the SAMHD1 Protein ». *Nature* 474(7353):658-61. doi: 10.1038/nature10195.
- Huang, Lu, Guan-lan Xu, Jian-qi Zhang, Ling Tian, Jing-lun Xue, Jin-zhong Chen, et William Jia. 2008. « Daxx Interacts with HIV-1 Integrase and Inhibits Lentiviral Gene Expression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373(2):241-45. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.017.
- Hulme, Amy E., Z. Kelley, Deirdre Foley, et Thomas J. Hope. 2015. « Complementary Assays Reveal a Low Level of CA Associated with Viral Complexes in the Nuclei of HIV-1-Infected Cells ». *Journal of Virology* 89(10):5350-61. doi: 10.1128/JVI.00476-15.

- Hulme, Amy E., Omar Perez, et Thomas J. Hope. 2011. « Complementary Assays Reveal a Relationship between HIV-1 Uncoating and Reverse Transcription ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(24):9975-80. doi: 10.1073/pnas.1014522108.
- Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, et G. G. Maul. 1999. « PML Is Critical for ND10 Formation and Recruits the PML-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by SUMO-1 ». *The Journal of Cell Biology* 147(2):221-34. doi: 10.1083/jcb.147.2.221.
- Ishov, Alexander M., Olga V. Vladimirova, et Gerd G. Maul. 2004. « Heterochromatin and ND10 Are Cell-Cycle Regulated and Phosphorylation-Dependent Alternate Nuclear Sites of the Transcription Repressor Daxx and SWI/SNF Protein ATRX ». *Journal of Cell Science* 117(Pt 17):3807-20. doi: 10.1242/jcs.01230.
- Jakobsen, Martin R., Rasmus O. Bak, Annika Andersen, Randi K. Berg, Søren B. Jensen, Jin Tengchuan, Tengchuan Jin, Anders Laustsen, Kathrine Hansen, Lars Ostergaard, Katherine A. Fitzgerald, T. Sam Xiao, Jacob G. Mikkelsen, Trine H. Mogensen, et Søren R. Paludan. 2013. « IFI16 Senses DNA Forms of the Lentiviral Replication Cycle and Controls HIV-1 Replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(48):E4571-4580. doi: 10.1073/pnas.1311669110.
- Jang, Moon-Sun, Seung-Wook Ryu, et Eunhee Kim. 2002. « Modification of Daxx by Small Ubiquitin-Related Modifier-1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295(2):495-500. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00699-X.
- Javanbakht, Hassan, Wen Yuan, Darwin F. Yeung, Byeongwoon Song, Felipe Diaz-Griffero, Yuan Li, Xing Li, Matthew Stremlau, et Joseph Sodroski. 2006. « Characterization of TRIM5alpha Trimerization and Its Contribution to Human Immunodeficiency Virus Capsid Binding ». *Virology* 353(1):234-46. doi: 10.1016/j.virol.2006.05.017.
- Jentsch, Stefan, et Ivan Psakhye. 2013. « Control of Nuclear Activities by Substrate-Selective and Protein-Group SUMOylation ». *Annual Review of Genetics* 47:167-86. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133453.
- Jo, Ukhyun, Winson Cai, Jingming Wang, Yoojin Kwon, Alan D. D'Andrea, et Hyungjin Kim. 2016. « PCNA-Dependent Cleavage and Degradation of SDE2 Regulates Response to Replication Stress ». *PLoS Genetics* 12(12):e1006465. doi: 10.1371/journal.pgen.1006465.
- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, R. J. Dohmen, et G. Blobel. 1997. « The Ubiquitin-like Protein Smt3p Is Activated for Conjugation to Other Proteins by an Aos1p/Uba2p Heterodimer ». *The EMBO Journal* 16(18):5509-19. doi: 10.1093/emboj/16.18.5509.
- Jowett, J. B., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen, et I. S. Chen. 1995. « The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Gene Arrests Infected T Cells in the G2 + M Phase of the Cell Cycle ». *Journal of Virology* 69(10):6304-13.

- Kahle, Tanja, Bianca Volkmann, Kristin Eissmann, Alexandra Herrmann, Sven Schmitt, Sabine Wittmann, Laura Merkel, Nina Reuter, Thomas Stamminger, et Thomas Gramberg. 2015. « TRIM19/PML Restricts HIV Infection in a Cell Type-Dependent Manner ». *Viruses* 8(1). doi: 10.3390/v8010002.
- Kahyo, Tomoaki, Tamotsu Nishida, et Hideyo Yasuda. 2001. « Involvement of PIAS1 in the Sumoylation of Tumor Suppressor P53 ». *Molecular Cell* 8(3):713-18. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00349-5.
- Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani, et E. T. Yeh. 1998. « Identification of Three Major Sentrinization Sites in PML ». *The Journal of Biological Chemistry* 273(41):26675-82. doi: 10.1074/jbc.273.41.26675.
- Kamitani, Tetsu, Hung Phi Nguyen, et Edward T. H. Yeh. 1997. « Preferential Modification of Nuclear Proteins by a Novel Ubiquitin-like Molecule ». *Journal of Biological Chemistry* 272(22):14001-4. doi: 10.1074/jbc.272.22.14001.
- Kane, Melissa, Shalini S. Yadav, Julia Bitzegeio, Sebla B. Kutluay, Trinity Zang, Sam J. Wilson, John W. Schoggins, Charles M. Rice, Masahiro Yamashita, Theodora Hatzioannou, et Paul D. Bieniasz. 2013. « MX2 Is an Interferon-Induced Inhibitor of HIV-1 Infection ». *Nature* 502(7472):563-66. doi: 10.1038/nature12653.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, et B. M. Peterlin. 1987. « Anti-Termination of Transcription within the Long Terminal Repeat of HIV-1 by Tat Gene Product ». *Nature* 330(6147):489-93. doi: 10.1038/330489a0.
- Karn, Jonathan, et C. Martin Stoltzfus. 2012. « Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(2):a006916. doi: 10.1101/cshperspect.a006916.
- Keele, Brandon F., Elena E. Giorgi, Jesus F. Salazar-Gonzalez, Julie M. Decker, Kimmy T. Pham, Maria G. Salazar, Chuanxi Sun, Truman Grayson, Shuyi Wang, Hui Li, Xiping Wei, Chunlai Jiang, Jennifer L. Kirchherr, Feng Gao, Jeffery A. Anderson, Li-Hua Ping, Ronald Swanstrom, Georgia D. Tomaras, William A. Blattner, Paul A. Goepfert, J. Michael Kilby, Michael S. Saag, Eric L. Delwart, Michael P. Busch, Myron S. Cohen, David C. Montefiori, Barton F. Haynes, Brian Gaschen, Gayathri S. Athreya, Ha Y. Lee, Natasha Wood, Cathal Seoighe, Alan S. Perelson, Tanmoy Bhattacharya, Bette T. Korber, Beatrice H. Hahn, et George M. Shaw. 2008. « Identification and Characterization of Transmitted and Early Founder Virus Envelopes in Primary HIV-1 Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(21):7552-57. doi: 10.1073/pnas.0802203105.
- Kim, Kyusik, Ann Dauphin, Sevnur Komurlu, Sean M. McCauley, Leonid Yurkovetskiy, Claudia Carbone, William E. Diehl, Caterina Strambio-De-Castillia, Edward M. Campbell, et Jeremy Luban. 2019. « Cyclophilin A Protects HIV-1 from Restriction by Human TRIM5 α ». *Nature Microbiology* 4(12):2044-51. doi: 10.1038/s41564-019-0592-5.

- Kirchhoff, Frank. 2018. « HIV Life Cycle: Overview ». P. 722-30 in *Encyclopedia of AIDS*, édité par T. J. Hope, D. D. Richman, et M. Stevenson. New York, NY: Springer.
- Kitamura, Tetsuya, Yayoi Fukuyo, Masahiro Inoue, Nobuko T. Horikoshi, Masanobu Shindoh, Buck E. Rogers, Anny Usheva, et Nobuo Horikoshi. 2009. « Mutant P53 Disrupts the Stress MAPK Activation Circuit Induced by ASK1-Dependent Stabilization of Daxx ». *Cancer Research* 69(19):7681-88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2133.
- Ko, Y. G., Y. S. Kang, H. Park, W. Seol, J. Kim, T. Kim, H. S. Park, E. J. Choi, et S. Kim. 2001. « Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Controls the Proapoptotic Function of Death-Associated Protein (Daxx) in the Cytoplasm ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(42):39103-6. doi: 10.1074/jbc.M105928200.
- Kuo, Hong-Yi, Che-Chang Chang, Jen-Chong Jeng, Hui-Mei Hu, Ding-Yen Lin, Gerd G. Maul, Roland P. S. Kwok, et Hsiu-Ming Shih. 2005. « SUMO Modification Negatively Modulates the Transcriptional Activity of CREB-Binding Protein via the Recruitment of Daxx ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(47):16973-78. doi: 10.1073/pnas.0504460102.
- Kurepa, Jasmina, Joseph M. Walker, Jan Smalle, Mark M. Gosink, Seth J. Davis, Tessa L. Durham, Dong-Yul Sung, et Richard D. Vierstra. 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(9):6862-72. doi: 10.1074/jbc.M209694200.
- Kyei, George Boateng, Xiaogang Cheng, Rashmi Ramani, et Lee Ratner. 2015. « Cyclin L2 Is a Critical HIV Dependency Factor in Macrophages That Controls SAMHD1 Abundance ». *Cell Host & Microbe* 17(1):98-106. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.009.
- Laguette, N., S. Benichou, et S. Basmaciogullari. 2008. « Effet de la protéine régulatrice Nef sur le pouvoir infectieux du virus de l'immunodéficience humaine ». *Virologie* 12(6):439-51. doi: 10.1684/vir.2008.0213.
- Laguette, Nadine, Bijan Sobhian, Nicoletta Casartelli, Mathieu Ringiard, Christine Chable-Bessia, Emmanuel Ségéral, Ahmad Yatim, Stéphane Emiliani, Olivier Schwartz, et Monsef Benkirane. 2011. « SAMHD1 Is the Dendritic- and Myeloid-Cell-Specific HIV-1 Restriction Factor Counteracted by Vpx ». *Nature* 474(7353):654-57. doi: 10.1038/nature10117.
- Lahaye, Xavier, Takeshi Satoh, Matteo Gentili, Silvia Cerboni, Cécile Conrad, Ilse Hurbain, Ahmed El Marjou, Christine Lacabaratz, Jean-Daniel Lelièvre, et Nicolas Manel. 2013. « The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral CDNA by the Innate Sensor CGAS in Dendritic Cells ». *Immunity* 39(6):1132-42. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.002.
- Lahouassa, Hichem, Marie-Lise Blondot, Lise Chauveau, Ghina Chougui, Marina Morel, Marjorie Leduc, François Guillonneau, Bertha Cecilia Ramirez, Olivier Schwartz, et Florence Margottin-Goguet. 2016. « HIV-1 Vpr Degrades the HLTF DNA Translocase in T Cells and Macrophages ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(19):5311-16. doi: 10.1073/pnas.1600485113.

- Lahouassa, Hichem, Waaqo Daddacha, Henning Hofmann, Diana Ayinde, Eric C. Logue, Loïc Dragin, Nicolin Bloch, Claire Maudet, Matthieu Bertrand, Thomas Gramberg, Gianfranco Pancino, Stéphane Priet, Bruno Canard, Nadine Laguette, Monsef Benkirane, Catherine Transy, Nathaniel R. Landau, Baek Kim, et Florence Margottin-Goguet. 2012. « SAMHD1 Restricts the Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Depleting the Intracellular Pool of Deoxynucleoside Triphosphates ». *Nature Immunology* 13(3):223-28. doi: 10.1038/ni.2236.
- Lalioji, Vassiliki S., Silvia Vergarajauregui, Diego Pulido, et Ignacio V. Sandoval. 2002. « The Insulin-Sensitive Glucose Transporter, GLUT4, Interacts Physically with Daxx. Two Proteins with Capacity to Bind Ubc9 and Conjugated to SUMO1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(22):19783-91. doi: 10.1074/jbc.M110294200.
- Lama, J., A. Mangasarian, et D. Trono. 1999. « Cell-Surface Expression of CD4 Reduces HIV-1 Infectivity by Blocking Env Incorporation in a Nef- and Vpu-Inhibitible Manner ». *Current Biology: CB* 9(12):622-31. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80284-x.
- Lapenta, Vincenza, Pietro Chiurazzi, Peter van der Spek, Antonio Pizzuti, Fumio Hanaoka, et Christina Brahe. 1997. « SMT3A, a Human Homologue of TheS. Cerevisiae SMT3 Gene, Maps to Chromosome 21qter and Defines a Novel Gene Family ». *Genomics* 40(2):362-66. doi: 10.1006/geno.1996.4556.
- Lehembre, F., S. Müller, P. P. Pandolfi, et A. Dejean. 2001. « Regulation of Pax3 Transcriptional Activity by SUMO-1-Modified PML ». *Oncogene* 20(1):1-9. doi: 10.1038/sj.onc.1204063.
- Lelek, Mickaël, Nicoletta Casartelli, Danilo Pellin, Ermanno Rizzi, Philippe Souque, Marco Severgnini, Clelia Di Serio, Thomas Fricke, Felipe Diaz-Griffero, Christophe Zimmer, Pierre Charneau, et Francesca Di Nunzio. 2015. « Chromatin Organization at the Nuclear Pore Favours HIV Replication ». *Nature Communications* 6(1):1-12. doi: 10.1038/ncomms7483.
- Lewis, Peter W., Simon J. Elsaesser, Kyung-Min Noh, Sonja C. Stadler, et C. David Allis. 2010. « Daxx Is an H3.3-Specific Histone Chaperone and Cooperates with ATRX in Replication-Independent Chromatin Assembly at Telomeres ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(32):14075-80. doi: 10.1073/pnas.1008850107.
- Li, H., C. Leo, J. Zhu, X. Wu, J. O'Neil, E. J. Park, et J. D. Chen. 2000. « Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML ». *Molecular and Cellular Biology* 20(5):1784-96. doi: 10.1128/mcb.20.5.1784-1796.2000.
- Li, Jinghe, Liangyue Qian, John P. Dowling, Christine Curcione, Drishya Kurup, et Jianke Zhang. 2017. « Daxx Plays a Novel Role in T Cell Survival but Is Dispensable in Fas-Induced Apoptosis ». *PLoS One* 12(3):e0174011. doi: 10.1371/journal.pone.0174011.
- Li, Manqing, Elaine Kao, Xia Gao, Hilary Sandig, Kirsten Limmer, Mariana Pavon-Eternod, Thomas E. Jones, Sebastien Landry, Tao Pan, Matthew D. Weitzman, et Michael David. 2012. « Codon-Usage-

- Based Inhibition of HIV Protein Synthesis by Human Schlafen 11 ». *Nature* 491(7422):125-28. doi: 10.1038/nature11433.
- Li, Qinxi, Xuan Wang, Xiaoling Wu, Yanning Rui, Wei Liu, Jifeng Wang, Xinghao Wang, Yih-Cherng Liou, Zhiyun Ye, et Sheng-Cai Lin. 2007. « Daxx Cooperates with the Axin/HIPK2/P53 Complex to Induce Cell Death ». *Cancer Research* 67(1):66-74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1671.
- Li, S. J., et M. Hochstrasser. 2000. « The Yeast ULP2 (SMT4) Gene Encodes a Novel Protease Specific for the Ubiquitin-like Smt3 Protein ». *Molecular and Cellular Biology* 20(7):2367-77. doi: 10.1128/mcb.20.7.2367-2377.2000.
- Li, Shi-Fang, Mei-Jiao Gong, Fu-Rong Zhao, Jun-Jun Shao, Yin-Li Xie, Yong-Guang Zhang, et Hui-Yun Chang. 2018. « Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 51(5):2377-96. doi: 10.1159/000495897.
- Li, Xing, et Joseph Sodroski. 2008. « The TRIM5alpha B-Box 2 Domain Promotes Cooperative Binding to the Retroviral Capsid by Mediating Higher-Order Self-Association ». *Journal of Virology* 82(23):11495-502. doi: 10.1128/JVI.01548-08.
- Li, Yen-Li, Viswanathan Chandrasekaran, Stephen D. Carter, Cora L. Woodward, Devin E. Christensen, Kelly A. Dryden, Owen Pornillos, Mark Yeager, Barbie K. Ganser-Pornillos, Grant J. Jensen, et Wesley I. Sundquist. 2016. « Primate TRIM5 Proteins Form Hexagonal Nets on HIV-1 Capsids ». *ELife* 5. doi: 10.7554/eLife.16269.
- Li, Yuan, Alak Kanti Kar, et Joseph Sodroski. 2009. « Target Cell Type-Dependent Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Disassembly by Cyclophilin A ». *Journal of Virology* 83(21):10951-62. doi: 10.1128/JVI.00682-09.
- Li, Zhihui, Shuwen Wu, Jingjing Wang, Wenjuan Li, Yun Lin, Chaoneng Ji, Jinglun Xue, et Jinzhong Chen. 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(5):1053-60. doi: 10.3892/ijmm.2012.1088.
- Li, Zhuang, Dan Zhao, Bin Xiang, et Haitao Li. 2017. « Structural and Biochemical Characterization of DAXX-ATRAX Interaction ». *Protein & Cell* 8(10):762-66. doi: 10.1007/s13238-017-0463-x.
- Liang, Ya-Chen, Chia-Chin Lee, Ya-Li Yao, Chien-Chen Lai, M. Lienhard Schmitz, et Wen-Ming Yang. 2016. « SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies ». *Scientific Reports* 6:26509. doi: 10.1038/srep26509.
- Lienlaf, Maritza, Fumiaki Hayashi, Francesca Di Nunzio, Naoya Tochio, Takanori Kigawa, Shigeyuki Yokoyama, et Felipe Diaz-Griffero. 2011. « Contribution of E3-Ubiquitin Ligase Activity to HIV-1 Restriction by TRIM5alpha(Rh): Structure of the RING Domain of TRIM5alpha ». *Journal of Virology* 85(17):8725-37. doi: 10.1128/JVI.00497-11.

- Lin, Ding-Yen, Yen-Sung Huang, Jen-Chong Jeng, Hong-Yi Kuo, Che-Chang Chang, Ting-Ting Chao, Chun-Chen Ho, Yun-Ching Chen, Tong-Ping Lin, Hsin-I. Fang, Chih-Chang Hung, Ching-Shu Suen, Ming-Jing Hwang, Kun-Sang Chang, Gerd G. Maul, et Hsiu-Ming Shih. 2006. « Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors ». *Molecular Cell* 24(3):341-54. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.019.
- Lin, Ding-Yen, et Hsiu-Ming Shih. 2002. « Essential Role of the 58-KDa Microspherule Protein in the Modulation of Daxx-Dependent Transcriptional Repression as Revealed by Nucleolar Sequestration ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(28):25446-56. doi: 10.1074/jbc.M200633200.
- Lin, Hui-Kuan, Stephan Bergmann, et Pier Paolo Pandolfi. 2004. « Cytoplasmic PML Function in TGF-Beta Signalling ». *Nature* 431(7005):205-11. doi: 10.1038/nature02783.
- Lindsay, Cory R., Serena Giovinnazzi, et Alexander M. Ishov. 2009. « Daxx Is a Predominately Nuclear Protein That Does Not Translocate to the Cytoplasm in Response to Cell Stress ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8(10):1544-51. doi: 10.4161/cc.8.10.8379.
- Liu, Chuang, Juan R. Perilla, Jiying Ning, Manman Lu, Guangjin Hou, Ruben Ramalho, Benjamin A. Himes, Gongpu Zhao, Gregory J. Bedwell, In-Ja Byeon, Jinwoo Ahn, Angela M. Gronenborn, Peter E. Prevelige, Itay Rousso, Christopher Aiken, Tatyana Polenova, Klaus Schulten, et Peijun Zhang. 2016. « Cyclophilin A Stabilizes the HIV-1 Capsid through a Novel Non-Canonical Binding Site ». *Nature Communications* 7:10714. doi: 10.1038/ncomms10714.
- Liu, Zhenlong, Qinghua Pan, Shilei Ding, Jin Qian, Fengwen Xu, Jinming Zhou, Shan Cen, Fei Guo, et Chen Liang. 2013. « The Interferon-Inducible MxB Protein Inhibits HIV-1 Infection ». *Cell Host & Microbe* 14(4):398-410. doi: 10.1016/j.chom.2013.08.015.
- Lu, Jennifer, Qinghua Pan, Liwei Rong, Wei He, Shan-Lu Liu, et Chen Liang. 2011. « The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection ». *Journal of Virology* 85(5):2126-37. doi: 10.1128/JVI.01531-10.
- Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, et S. P. Goff. 1993. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Binds to Cyclophilins A and B ». *Cell* 73(6):1067-78. doi: 10.1016/0092-8674(93)90637-6.
- Lusic, Marina, Bruna Marini, Hashim Ali, Bojana Lucic, Roberto Luzzati, et Mauro Giacca. 2013. « Proximity to PML Nuclear Bodies Regulates HIV-1 Latency in CD4+ T Cells ». *Cell Host & Microbe* 13(6):665-77. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.006.
- Maarifi, Ghizlane, Juliette Fernandez, Débora M. Portilho, Aude Boulay, Jacques Dutrieux, Stéphane Oddos, Gillian Butler-Browne, Sébastien Nisole, et Nathalie J. Arhel. 2018. « RanBP2 regulates the anti-retroviral activity of TRIM5 α by SUMOylation at a predicted phosphorylated SUMOylation motif ». *Communications Biology* 1. doi: 10.1038/s42003-018-0198-0.

- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, et R. Axel. 1986. « The T4 Gene Encodes the AIDS Virus Receptor and Is Expressed in the Immune System and the Brain ». *Cell* 47(3):333-48. doi: 10.1016/0092-8674(86)90590-8.
- Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, et F. Melchior. 1997. « A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2 ». *Cell* 88(1):97-107. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81862-0.
- Mahmud, Iqbal, et Daiqing Liao. 2019. « DAXX in Cancer: Phenomena, Processes, Mechanisms and Regulation ». *Nucleic Acids Research* 47(15):7734-52. doi: 10.1093/nar/gkz634.
- Maillet, Sarah, Juliette Fernandez, Mathilde Decourcelle, Khadija El Koulali, Fabien P. Blanchet, Nathalie J. Arhel, Ghizlane Maarifi, et Sébastien Nisole. 2020. « Daxx Inhibits HIV-1 Reverse Transcription and Uncoating in a SUMO-Dependent Manner ». *Viruses* 12(6):636. doi: 10.3390/v12060636.
- Maillet, Sarah, et Sébastien Nisole. 2016. « Daxx, a Broad-Spectrum Viral Restriction Factor ». *Virologie (Montrouge, France)* 20(5):261-72. doi: 10.1684/vir.2016.0667.
- Mak, Tak W., et Mary E. Saunders. 2006. « 25 - HIV and Acquired Immunodeficiency Syndrome ». P. 785-823 in *The Immune Response*, édité par T. W. Mak et M. E. Saunders. Burlington: Academic Press.
- Malikov, Viacheslav, Eveline Santos da Silva, Vladimir Jovasevic, Geoffrey Bennett, Daniel A. de Souza Aranha Vieira, Bianca Schulte, Felipe Diaz-Griffero, Derek Walsh, et Mojgan H. Naghavi. 2015. « HIV-1 Capsids Bind and Exploit the Kinesin-1 Adaptor FEZ1 for Inward Movement to the Nucleus ». *Nature Communications* 6:6660. doi: 10.1038/ncomms7660.
- Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, et B. R. Cullen. 1989. « The HIV-1 Rev Trans-Activator Acts through a Structured Target Sequence to Activate Nuclear Export of Unspliced Viral MRNA ». *Nature* 338(6212):254-57. doi: 10.1038/338254a0.
- Mancarella, Antonio, Francesco A. Procopio, Tilmann Achsel, Elisa De Crignis, Brian T. Foley, Giampietro Corradin, Claudia Bagni, Giuseppe Pantaleo, et Cecilia Graziosi. 2019. « Detection of antisense protein (ASP) RNA transcripts in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ». *Journal of General Virology*, 100(5):863-76. doi: 10.1099/jgv.0.001244.
- Mangeat, Bastien, Priscilla Turelli, Gersende Caron, Marc Friedli, Luc Perrin, et Didier Trono. 2003. « Broad Antiretroviral Defence by Human APOBEC3G through Lethal Editing of Nascent Reverse Transcripts ». *Nature* 424(6944):99-103. doi: 10.1038/nature01709.
- Marin, Mariana, Kristine M. Rose, Susan L. Kozak, et David Kabat. 2003. « HIV-1 Vif Protein Binds the Editing Enzyme APOBEC3G and Induces Its Degradation ». *Nature Medicine* 9(11):1398-1403. doi: 10.1038/nm946.
- Marini, Bruna, Attila Kertesz-Farkas, Hashim Ali, Bojana Lucic, Kamil Lisek, Lara Manganaro, Sandor Pongor, Roberto Luzzati, Alessandra Recchia, Fulvio Mavilio, Mauro Giacca, et Marina Lusic. 2015.

« Nuclear Architecture Dictates HIV-1 Integration Site Selection ». *Nature* 521(7551):227-31. doi: 10.1038/nature14226.

Martin, Stéphane, Kevin A. Wilkinson, Atsushi Nishimune, et Jeremy M. Henley. 2007. « Emerging Extranuclear Roles of Protein SUMOylation in Neuronal Function and Dysfunction ». *Nature Reviews Neuroscience* 8(12):948-59. doi: 10.1038/nrn2276.

Martinat, Charlotte, Arthur Cormier, Joëlle Tobaly-Tapiero, Noé Palmic, Nicoletta Casartelli, Si'Ana A. Coggins, Julian Buchrieser, Mirjana Persaud, Felipe Diaz-Griffero, Lucile Espert, Guillaume Bossis, Pascale Lesage, Olivier Schwartz, Baek Kim, Florence Margottin-Goguet, Ali Saïb, et Alessia Zamborlini. 2020. « SUMOylation of SAMHD1 at Lysine 595 Is Required for HIV-1 Restriction in Non-Cycling Cells ». *BioRxiv* 2020.06.04.133439. doi: 10.1101/2020.06.04.133439.

Masclé, Xavier H., Christina Gagnon, Haytham M. Wahba, Mathieu Lussier-Price, Laurent Cappadocia, Kazuyasu Sakaguchi, et James G. Omichinski. 2019. « Acetylation of SUMO1 Alters Interactions with the SIMs of PML and Daxx in a Protein-Specific Manner ». *Structure (London, England: 1993)*. doi: 10.1016/j.str.2019.11.019.

Masroori, Nasser, Pearl Cherry, Natacha Merindol, Jia-Xin Li, Caroline Dufour, Lina Poulain, Mélodie B. Plourde, et Lionel Berthoux. 2017. « Gene Knockout Shows That PML (TRIM19) Does Not Restrict the Early Stages of HIV-1 Infection in Human Cell Lines ». *MSphere* 2(3). doi: 10.1128/mSphereDirect.00233-17.

Masroori, Nasser, Natacha Merindol, et Lionel Berthoux. 2016. « The Interferon-Induced Antiviral Protein PML (TRIM19) Promotes the Restriction and Transcriptional Silencing of Lentiviruses in a Context-Specific, Isoform-Specific Fashion ». *Retrovirology* 13:19. doi: 10.1186/s12977-016-0253-1.

Matic, Ivan, Martijn van Hagen, Joost Schimmel, Boris Macek, Stephen C. Ogg, Michael H. Tatham, Ronald T. Hay, Angus I. Lamond, Matthias Mann, et Alfred C. O. Vertegaal. 2008. « In Vivo Identification of Human Small Ubiquitin-like Modifier Polymerization Sites by High Accuracy Mass Spectrometry and an in Vitro to in Vivo Strategy », *Molecular & cellular proteomics: MCP* 7(1). doi: 10.1074/mcp.M700173-MCP200.

Matic, Ivan, Joost Schimmel, Ivo A. Hendriks, Maria A. van Santen, Frans van de Rijke, Hans van Dam, Florian Gnad, Matthias Mann, et Alfred C. O. Vertegaal. 2010. « Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif ». *Molecular Cell* 39(4):641-52. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.026.

Mattei, Simone, Bärbel Glass, Wim J. H. Hagen, Hans-Georg Kräusslich, et John A. G. Briggs. 2016. « The Structure and Flexibility of Conical HIV-1 Capsids Determined within Intact Virions ». *Science* 354(6318):1434-37. doi: 10.1126/science.aah4972.

- Matunis, M. J., E. Coutavas, et G. Blobel. 1996. « A Novel Ubiquitin-like Modification Modulates the Partitioning of the Ran-GTPase-Activating Protein RanGAP1 between the Cytosol and the Nuclear Pore Complex. » *Journal of Cell Biology* 135(6):1457-70. doi: 10.1083/jcb.135.6.1457.
- McDonald, David, Marie A. Vodicka, Ginger Lucero, Tatyana M. Svitkina, Gary G. Borisy, Michael Emerman, et Thomas J. Hope. 2002. « Visualization of the Intracellular Behavior of HIV in Living Cells ». *The Journal of Cell Biology* 159(3):441-52. doi: 10.1083/jcb.200203150.
- McDougal, J. S., M. S. Kennedy, J. M. Slish, S. P. Cort, A. Mawle, et J. K. Nicholson. 1986. « Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T Cells by a Complex of the 110K Viral Protein and the T4 Molecule ». *Science* 231(4736):382-85. doi: 10.1126/science.3001934.
- Meier, Angela, Galit Alter, Nicole Frahm, Harlyn Sidhu, Bin Li, Aranya Bagchi, Nickolas Teigen, Hendrik Streeck, Hans-Juergen Stellbrink, Judith Hellman, Jan van Lunzen, et Marcus Altfeld. 2007. « MyD88-Dependent Immune Activation Mediated by Human Immunodeficiency Virus Type 1-Encoded Toll-like Receptor Ligands ». *Journal of Virology* 81(15):8180-91. doi: 10.1128/JVI.00421-07.
- Meluh, P. B., et D. Koshland. 1995. « Evidence That the MIF2 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes a Centromere Protein with Homology to the Mammalian Centromere Protein CENP-C ». *Molecular Biology of the Cell* 6(7):793-807. doi: 10.1091/mbc.6.7.793.
- Michaelson, J. S., D. Bader, F. Kuo, C. Kozak, et P. Leder. 1999. « Loss of Daxx, a Promiscuously Interacting Protein, Results in Extensive Apoptosis in Early Mouse Development ». *Genes & Development* 13(15):1918-23. doi: 10.1101/gad.13.15.1918.
- Miller, M. D., C. M. Farnet, et F. D. Bushman. 1997. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes: Studies of Organization and Composition. » *Journal of Virology* 71(7):5382-90.
- Miller, R. H. 1988. « Human Immunodeficiency Virus May Encode a Novel Protein on the Genomic DNA plus Strand ». *Science* 239(4846):1420-22. doi: 10.1126/science.3347840.
- Monroe, Kathryn M., Zhiyuan Yang, Jeffrey R. Johnson, Xin Geng, Gilad Doitsh, Nevan J. Krogan, et Warner C. Greene. 2014. « IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV ». *Science (New York, N.Y.)* 343(6169):428-32. doi: 10.1126/science.1243640.
- Morozov, V. M., N. A. Massoll, O. V. Vladimirova, G. G. Maul, et A. M. Ishov. 2008. « Regulation of C-Met Expression by Transcription Repressor Daxx ». *Oncogene* 27(15):2177-86. doi: 10.1038/sj.onc.1210865.
- Mukhopadhyay, Debaditya, Ferhan Ayaydin, Nagamalleswari Kolli, Shyh-Han Tan, Tadashi Anan, Ai Kametaka, Yoshiaki Azuma, Keith D. Wilkinson, et Mary Dasso. 2006. « SUSP1 Antagonizes Formation of Highly SUMO2/3-Conjugated Species ». *The Journal of Cell Biology* 174(7):939-49. doi: 10.1083/jcb.200510103.

- Munir, Soundasse, Sylvain Thierry, Frédéric Subra, Eric Deprez, et Olivier Delelis. 2013. « Quantitative Analysis of the Time-Course of Viral DNA Forms during the HIV-1 Life Cycle ». *Retrovirology* 10(1):1-18. doi: 10.1186/1742-4690-10-87.
- Munro, James B., et Walther Mothes. 2015. « Structure and Dynamics of the Native HIV-1 Env Trimer ». *Journal of Virology* 89(11):5752-55. doi: 10.1128/JVI.03187-14.
- Muromoto, R., K. Nakao, T. Watanabe, N. Sato, Y. Sekine, K. Sugiyama, K. Oritani, K. Shimoda, et T. Matsuda. 2006. « Physical and Functional Interactions between Daxx and STAT3 ». *Oncogene* 25(14):2131-36. doi: 10.1038/sj.onc.1209235.
- Muthumani, K., L. J. Montaner, V. Ayyavoo, et D. B. Weiner. 2000. « Vpr-GFP Virion Particle Identifies HIV-Infected Targets and Preserves HIV-1Vpr Function in Macrophages and T-Cells ». *DNA and Cell Biology* 19(3):179-88. doi: 10.1089/104454900314564.
- Nacerddine, Karim, François Lehenbre, Mantu Bhaumik, Jérôme Artus, Michel Cohen-Tannoudji, Charles Babinet, Pier Paolo Pandolfi, et Anne Dejean. 2005. « The SUMO Pathway Is Essential for Nuclear Integrity and Chromosome Segregation in Mice ». *Developmental Cell* 9(6):769-79. doi: 10.1016/j.devcel.2005.10.007.
- Nazli, Aisha, Sara Dizzell, Muhammad Atif Zahoor, Victor H. Ferreira, Jessica Kafka, Matthew William Woods, Michel Ouellet, Ali A. Ashkar, Michel J. Tremblay, Dawn Me Bowdish, et Charu Kaushic. 2019. « Interferon- β Induced in Female Genital Epithelium by HIV-1 Glycoprotein 120 via Toll-like-Receptor 2 Pathway Acts to Protect the Mucosal Barrier ». *Cellular & Molecular Immunology* 16(2):178-94. doi: 10.1038/cmi.2017.168.
- Nazli, Aisha, Jessica K. Kafka, Victor H. Ferreira, Varun Anipindi, Kristen Mueller, Brendan J. Osborne, Sara Dizzell, Sarah Chauvin, M. Firoz Mian, Michel Ouellet, Michel J. Tremblay, Karen L. Mossman, Ali A. Ashkar, Colin Kovacs, Dawn M. E. Bowdish, Denis P. Snider, Rupert Kaul, et Charu Kaushic. 2013. « HIV-1 Gp120 Induces TLR2- and TLR4-Mediated Innate Immune Activation in Human Female Genital Epithelium ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191(8):4246-58. doi: 10.4049/jimmunol.1301482.
- Neil, Stuart J. D., Trinity Zang, et Paul D. Bieniasz. 2008. « Tetherin Inhibits Retrovirus Release and Is Antagonized by HIV-1 Vpu ». *Nature* 451(7177):425-30. doi: 10.1038/nature06553.
- Nishida, T., F. Kaneko, M. Kitagawa, et H. Yasuda. 2001. « Characterization of a Novel Mammalian SUMO-1/Smt3-Specific Isopeptidase, a Homologue of Rat Axam, Which Is an Axin-Binding Protein Promoting Beta-Catenin Degradation ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(42):39060-66. doi: 10.1074/jbc.M103955200.
- Nisole, Sébastien, Mohamed Ali Maroui, Xavier H. Mascle, Muriel Aubry, et Mounira K. Chelbi-Alix. 2013. « Differential Roles of PML Isoforms ». *Frontiers in Oncology* 3:125. doi: 10.3389/fonc.2013.00125.

- Nisole, Sébastien, Jonathan P. Stoye, et Ali Saïb. 2005. « TRIM Family Proteins: Retroviral Restriction and Antiviral Defence ». *Nature Reviews Microbiology* 3(10):799-808. doi: 10.1038/nrmicro1248.
- Nkwe, David O., Annegret Pelchen-Matthews, Jemima J. Burden, Lucy M. Collinson, et Mark Marsh. 2016. « The Intracellular Plasma Membrane-Connected Compartment in the Assembly of HIV-1 in Human Macrophages ». *BMC Biology* 14:50. doi: 10.1186/s12915-016-0272-3.
- Novikova, Mariia, Yulan Zhang, Eric O. Freed, et Ke Peng. 2019. « Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle ». *Virologica Sinica* 34(2):119-34. doi: 10.1007/s12250-019-00095-3.
- Ohainle, Molly, Kyusik Kim, Sevnur Komurlu Keceli, Abby Felton, Ed Campbell, Jeremy Luban, et Michael Emerman. 2020. « TRIM34 Restricts HIV-1 and SIV Capsids in a TRIM5 α -Dependent Manner ». *PLOS Pathogens* 16(4):e1008507. doi: 10.1371/journal.ppat.1008507.
- Okuma, Toru, Reiko Honda, Genya Ichikawa, Noriko Tsumagari, et Hideyo Yasuda. 1999. « In Vitro SUMO-1 Modification Requires Two Enzymatic Steps, E1 and E2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254(3):693-98. doi: 10.1006/bbrc.1998.9995.
- Okura, T., L. Gong, T. Kamitani, T. Wada, I. Okura, C. F. Wei, H. M. Chang, et E. T. Yeh. 1996. « Protection against Fas/APO-1- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Cell Death by a Novel Protein, Sentrin. » *The Journal of Immunology* 157(10):4277-81.
- Ono, Akira, Sherimay D. Ablan, Stephen J. Lockett, Kunio Nagashima, et Eric O. Freed. 2004. « Phosphatidylinositol (4,5) Bisphosphate Regulates HIV-1 Gag Targeting to the Plasma Membrane ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41):14889-94. doi: 10.1073/pnas.0405596101.
- Owerbach, David, Eileen M. McKay, Edward T. H. Yeh, Kenneth H. Gabbay, et Kurt M. Bohren. 2005. « A Proline-90 Residue Unique to SUMO-4 Prevents Maturation and Sumoylation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337(2):517-20. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.090.
- Park, Jinhwi, Jae Ho Lee, Muhnho La, Moon Jung Jang, Gil Woo Chae, Seung Beom Kim, Heejae Tak, Yunhwa Jung, Boohyeong Byun, Jeong Keun Ahn, et Cheol O. Joe. 2007. « Inhibition of NF-KB Acetylation and Its Transcriptional Activity by Daxx ». *Journal of Molecular Biology* 368(2):388-97. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.047.
- Peeters, Martine, Matthieu Jung, et Ahidjo Ayouba. 2013. « The origin and molecular epidemiology of HIV ». *Expert Review of Anti-infective Therapy* 11(9):885-96. doi: 10.1586/14787210.2013.825443.
- Peng, Gang, Ke Jian Lei, Wenwen Jin, Teresa Greenwell-Wild, et Sharon M. Wahl. 2006. « Induction of APOBEC3 Family Proteins, a Defensive Maneuver Underlying Interferon-Induced Anti-HIV-1 Activity ». *The Journal of Experimental Medicine* 203(1):41-46. doi: 10.1084/jem.20051512.
- Perlman, R., W. P. Schiemann, M. W. Brooks, H. F. Lodish, et R. A. Weinberg. 2001. « TGF-Beta-Induced Apoptosis Is Mediated by the Adapter Protein Daxx That Facilitates JNK Activation ». *Nature Cell Biology* 3(8):708-14. doi: 10.1038/35087019.

Pertel, Thomas, Stéphane Hausmann, Damien Morger, Sara Züger, Jessica Guerra, Josefina Lascano, Christian Reinhard, Federico A. Santoni, Pradeep D. Uchil, Laurence Chatel, Aurélie Bisiaux, Matthew L. Albert, Caterina Strambio-De-Castillia, Walther Mothes, Massimo Pizzato, Markus G. Grütter, et Jeremy Luban. 2011. « TRIM5 Is an Innate Immune Sensor for the Retrovirus Capsid Lattice ». *Nature* 472(7343):361-65. doi: 10.1038/nature09976.

Pichler, Andrea, Andreas Gast, Jacob S. Seeler, Anne Dejean, et Frauke Melchior. 2002. « The Nucleoporin RanBP2 Has SUMO1 E3 Ligase Activity ». *Cell* 108(1):109-20. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00633-x.

Pichler, Andrea, Puck Knipscheer, Edith Oberhofer, Willem J. van Dijk, Roman Körner, Jesper Velgaard Olsen, Stefan Jentsch, Frauke Melchior, et Titia K. Sixma. 2005. « SUMO Modification of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-25K ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12(3):264-69. doi: 10.1038/nsmb903.

Ping, Li-Hua, Sarah B. Joseph, Jeffrey A. Anderson, Melissa-Rose Abrahams, Jesus F. Salazar-Gonzalez, Laura P. Kincer, Florette K. Treurnicht, Leslie Arney, Suany Ojeda, Ming Zhang, Jessica Keys, E. Lake Potter, Haitao Chu, Penny Moore, Maria G. Salazar, Shilpa Iyer, Cassandra Jabara, Jennifer Kirchherr, Clement Mapanje, Nobubelo Ngandu, Cathal Seoighe, Irving Hoffman, Feng Gao, Yuyang Tang, Celia Labranche, Benhur Lee, Andrew Saville, Marion Vermeulen, Susan Fiscus, Lynn Morris, Salim Abdool Karim, Barton F. Haynes, George M. Shaw, Bette T. Korber, Beatrice H. Hahn, Myron S. Cohen, David Montefiori, Carolyn Williamson, Ronald Swanstrom, et CAPRISA Acute Infection Study and the Center for HIV-AIDS Vaccine Immunology Consortium. 2013. « Comparison of Viral Env Proteins from Acute and Chronic Infections with Subtype C Human Immunodeficiency Virus Type 1 Identifies Differences in Glycosylation and CCR5 Utilization and Suggests a New Strategy for Immunogen Design ». *Journal of Virology* 87(13):7218-33. doi: 10.1128/JVI.03577-12.

Pluta, A. F., W. C. Earnshaw, et I. G. Goldberg. 1998. « Interphase-Specific Association of Intrinsic Centromere Protein CENP-C with HDaxx, a Death Domain-Binding Protein Implicated in Fas-Mediated Cell Death ». *Journal of Cell Science* 111 (Pt 14):2029-41.

Pokutta, Sabine, Frauke Drees, Soichiro Yamada, W. James Nelson, et William I. Weis. 2008. « Biochemical and Structural Analysis of Alpha-Catenin in Cell-Cell Contacts ». *Biochemical Society Transactions* 36(Pt 2):141-47. doi: 10.1042/BST0360141.

Portilho, Débora M., Juliette Fernandez, Mathieu Ringiard, Anthony K. Machado, Aude Boulay, Martha Mayer, Michaela Müller-Trutwin, Anne-Sophie Beignon, Frank Kirchhoff, Sébastien Nisole, et Nathalie J. Arhel. 2016. « Endogenous TRIM5 α Function Is Regulated by SUMOylation and Nuclear Sequestration for Efficient Innate Sensing in Dendritic Cells ». *Cell Reports* 14(2):355-69. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.039.

- Puto, Lorena A., et John C. Reed. 2008. « Daxx Represses RelB Target Promoters via DNA Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation ». *Genes & Development* 22(8):998-1010. doi: 10.1101/gad.1632208.
- Rabellino, Andrea, Cristina Andreani, et Pier Paolo Scaglioni. 2017. « The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer ». *Cancer Research* 77(7):1542-47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2958.
- Rankovic, Sanela, Janani Varadarajan, Ruben Ramalho, Christopher Aiken, et Itay Rouso. 2017. « Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly ». *Journal of Virology* 91(12). doi: 10.1128/JVI.00289-17.
- Rasaiyaah, Jane, Choon Ping Tan, Adam J. Fletcher, Amanda J. Price, Caroline Blondeau, Laura Hilditch, David A. Jacques, David L. Selwood, Leo C. James, Mahdad Noursadeghi, et Greg J. Towers. 2013. « HIV-1 Evades Innate Immune Recognition through Specific Cofactor Recruitment ». *Nature* 503(7476):402-5. doi: 10.1038/nature12769.
- Rasmussen, Thomas A., Martin Tolstrup, Christel R. Brinkmann, Rikke Olesen, Christian Erikstrup, Ajantha Solomon, Anni Winckelmann, Sarah Palmer, Charles Dinarello, Maria Buzon, Mathias Lichterfeld, Sharon R. Lewin, Lars Østergaard, et Ole S. Søgaaard. 2014. « Panobinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor, for Latent-Virus Reactivation in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy: A Phase 1/2, Single Group, Clinical Trial ». *The Lancet. HIV* 1(1):e13-21. doi: 10.1016/S2352-3018(14)70014-1.
- Ringard, Mathieu, Virginie Marchand, Etienne Decroly, Yuri Motorin, et Yamina Bennasser. 2019. « FTSJ3 Is an RNA 2'-O-Methyltransferase Recruited by HIV to Avoid Innate Immune Sensing ». *Nature* 565(7740):500-504. doi: 10.1038/s41586-018-0841-4.
- Rodriguez, Manuel S., Catherine Dargemont, et Ronald T. Hay. 2001. « SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting ». *Journal of Biological Chemistry* 276(16):12654-59. doi: 10.1074/jbc.M009476200.
- Rosa, Annachiara, Ajit Chande, Serena Ziglio, Veronica De Sanctis, Roberto Bertorelli, Shih Lin Goh, Sean M. McCauley, Anetta Nowosielska, Stylianos E. Antonarakis, Jeremy Luban, Federico Andrea Santoni, et Massimo Pizzato. 2015. « HIV-1 Nef Promotes Infection by Excluding SERINC5 from Virion Incorporation ». *Nature* 526(7572):212-17. doi: 10.1038/nature15399.
- Rosonina, Emanuel, Akhi Akhter, Yimo Dou, John Babu, et Veroni S. Sri Theivakadadcham. 2017. « Regulation of Transcription Factors by Sumoylation ». *Transcription* 8(4):220-31. doi: 10.1080/21541264.2017.1311829.
- Ryo, Akihide, Akiko Hirai, Mayuko Nishi, Yih-Cherng Liou, Kilian Perrem, Sheng-Cai Lin, Hisashi Hirano, Sam W. Lee, et Ichiro Aoki. 2007. « A Suppressive Role of the Prolyl Isomerase Pin1 in Cellular Apoptosis Mediated by the Death-Associated Protein Daxx ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(50):36671-81. doi: 10.1074/jbc.M704145200.

- Ryoo, Jeongmin, Jongsu Choi, Changhoon Oh, Sungchul Kim, Minji Seo, Seok-Young Kim, Daekwan Seo, Jongkyu Kim, Tommy E. White, Alberto Brandariz-Nuñez, Felipe Diaz-Griffero, Cheol-Heui Yun, Joseph A. Hollenbaugh, Baek Kim, Daehyun Baek, et Kwangseog Ahn. 2014. « The Ribonuclease Activity of SAMHD1 Is Required for HIV-1 Restriction ». *Nature Medicine* 20(8):936-41. doi: 10.1038/nm.3626.
- Sachdev, Shrikesh, Laurakay Bruhn, Heidemarie Sieber, Andrea Pichler, Frauke Melchior, et Rudolf Grosschedl. 2001. « PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies ». *Genes & Development* 15(23):3088-3103. doi: 10.1101/gad.944801.
- Sadowski, Ivan, et Farhad B. Hashemi. 2019. « Strategies to Eradicate HIV from Infected Patients: Elimination of Latent Provirus Reservoirs ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76(18):3583-3600. doi: 10.1007/s00018-019-03156-8.
- Sahin, Umut, Omar Ferhi, Marion Jeanne, Shirine Benhenda, Caroline Berthier, Florence Jollivet, Michiko Niwa-Kawakita, Orestis Faklaris, Niclas Setterblad, Hugues de Thé, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2014. « Oxidative Stress-Induced Assembly of PML Nuclear Bodies Controls Sumoylation of Partner Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 204(6):931-45. doi: 10.1083/jcb.201305148.
- Saitoh, Hisato, et Joseph Hinchey. 2000. « Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-Related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3 ». *Journal of Biological Chemistry* 275(9):6252-58. doi: 10.1074/jbc.275.9.6252.
- Sakuma, Ryuta, Amber A. Mael, et Yasuhiro Ikeda. 2007. « Alpha Interferon Enhances TRIM5alpha-Mediated Antiviral Activities in Human and Rhesus Monkey Cells ». *Journal of Virology* 81(18):10201-6. doi: 10.1128/JVI.00419-07.
- Salomoni, Paolo, et Amel F. Khelifi. 2006. « Daxx: Death or Survival Protein? ». *Trends in Cell Biology* 16(2):97-104. doi: 10.1016/j.tcb.2005.12.002.
- Sampson, Deborah A., Min Wang, et Michael J. Matunis. 2001. « The Small Ubiquitin-like Modifier-1 (SUMO-1) Consensus Sequence Mediates Ubc9 Binding and Is Essential for SUMO-1 Modification ». *Journal of Biological Chemistry* 276(24):21664-69. doi: 10.1074/jbc.M100006200.
- Saphire, Andrew C. S., Michael D. Bobardt, et Philippe A. Gallay. 2002. « Cyclophilin a Plays Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry and Postentry Events, as Revealed by Spinoculation ». *Journal of Virology* 76(9):4671-77. doi: 10.1128/jvi.76.9.4671-4677.2002.
- Sarkis, Phuong Thi Nguyen, Songcheng Ying, Rongzhen Xu, et Xiao-Fang Yu. 2006. « STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN-Alpha ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(7):4530-40. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4530.
- Savoret, Juliette, Nathalie Chazal, Jean-Pierre Moles, Edouard Tuaille, Faroudy Boufassa, Laurence Meyer, Camille Lecuroux, Olivier Lambotte, Philippe Van De Perre, Jean-Michel Mesnard, et Antoine

- Gross. 2020. « A Pilot Study of the Humoral Response Against the AntiSense Protein (ASP) in HIV-1-Infected Patients ». *Frontiers in Microbiology* 11:20. doi: 10.3389/fmicb.2020.00020.
- Schoggins, John W., Sam J. Wilson, Maryline Panis, Mary Y. Murphy, Christopher T. Jones, Paul Bieniasz, et Charles M. Rice. 2011. « A Diverse Range of Gene Products Are Effectors of the Type I Interferon Antiviral Response ». *Nature* 472(7344):481-85. doi: 10.1038/nature09907.
- Schröder, Astrid R. W., Paul Shinn, Huaming Chen, Charles Berry, Joseph R. Ecker, et Frederic Bushman. 2002. « HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots ». *Cell* 110(4):521-29. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00864-4.
- Schwartz, O., V. Maréchal, S. Le Gall, F. Lemonnier, et J. M. Heard. 1996. « Endocytosis of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Is Induced by the HIV-1 Nef Protein ». *Nature Medicine* 2(3):338-42. doi: 10.1038/nm0396-338.
- Seamon, Kyle J., Zhiqiang Sun, Luda S. Shlyakhtenko, Yuri L. Lyubchenko, et James T. Stivers. 2015. « SAMHD1 Is a Single-Stranded Nucleic Acid Binding Protein with No Active Site-Associated Nuclease Activity ». *Nucleic Acids Research* 43(13):6486-99. doi: 10.1093/nar/gkv633.
- Seissler, Tanja, Roland Marquet, et Jean-Christophe Paillart. 2017. « Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins ». *Viruses* 9(11). doi: 10.3390/v9110322.
- Selyutina, Anastasia, Mirjana Persaud, Lacy M. Simons, Angel Bulnes-Ramos, Cindy Buffone, Alicia Martinez-Lopez, Viviana Scoca, Francesca Di Nunzio, Joseph Hiatt, Alexander Marson, Nevan J. Krogan, Judd F. Hultquist, et Felipe Diaz-Griffero. 2020. « Cyclophilin A Prevents HIV-1 Restriction in Lymphocytes by Blocking Human TRIM5 α Binding to the Viral Core ». *Cell Reports* 30(11):3766-3777.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.100.
- Seufert, Wolfgang, Bruce Futcher, et Stefan Jentsch. 1995. « Role of a Ubiquitin-Conjugating Enzyme in Degradation of S- and M-Phase Cyclins ». *Nature* 373(6509):78-81. doi: 10.1038/373078a0.
- Shah, Vaibhav B., et Christopher Aiken. 2011. « In Vitro Uncoating of HIV-1 Cores ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (57). doi: 10.3791/3384.
- Shah, Vaibhav B., Jiong Shi, David R. Hout, Ilker Oztop, Lavanya Krishnan, Jinwoo Ahn, Matthew S. Shotwell, Alan Engelman, et Christopher Aiken. 2013. « The Host Proteins Transportin SR2/TNPO3 and Cyclophilin A Exert Opposing Effects on HIV-1 Uncoating ». *Journal of Virology* 87(1):422-32. doi: 10.1128/JVI.07177-11.
- Sharp, Paul M., et Beatrice H. Hahn. 2011. « Origins of HIV and the AIDS Pandemic ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1):a006841. doi: 10.1101/cshperspect.a006841.
- Sheehy, Ann M., Nathan C. Gaddis, Jonathan D. Choi, et Michael H. Malim. 2002. « Isolation of a Human Gene That Inhibits HIV-1 Infection and Is Suppressed by the Viral Vif Protein ». *Nature* 418(6898):646-50. doi: 10.1038/nature00939.

- Sheehy, Ann M., Nathan C. Gaddis, et Michael H. Malim. 2003. « The Antiretroviral Enzyme APOBEC3G Is Degraded by the Proteasome in Response to HIV-1 Vif ». *Nature Medicine* 9(11):1404-7. doi: 10.1038/nm945.
- Shen, Lin Nan, Marie-Claude Geoffroy, Ellis G. Jaffray, et Ronald T. Hay. 2009. « Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-Specific Isopeptidase ». *The Biochemical Journal* 421(2):223-30. doi: 10.1042/BJ20090246.
- Shen, Tian Huai, Hui-Kuan Lin, Pier Paolo Scaglioni, Thomas M. Yung, et Pier Paolo Pandolfi. 2006. « The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation ». *Molecular Cell* 24(3):331-39. doi: 10.1016/j.molcel.2006.09.013.
- Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, J. C. Comeaux, R. K. Moyzis, et D. J. Chen. 1996. « Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, P53, and RAD51 Proteins in a Yeast Two-Hybrid System ». *Genomics* 37(2):183-86. doi: 10.1006/geno.1996.0540.
- Shen, Zhiyuan, Paige E. Pardington-Purtymun, Jarmon C. Comeaux, Robert K. Moyzis, et David J. Chen. 1996. « UBL1, a Human Ubiquitin-like Protein Associating with Human RAD51/RAD52 Proteins ». *Genomics* 36(2):271-79. doi: 10.1006/geno.1996.0462.
- Sherman, P. A., et J. A. Fyfe. 1990. « Human Immunodeficiency Virus Integration Protein Expressed in Escherichia Coli Possesses Selective DNA Cleaving Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(13):5119-23.
- Shi, Leilei, Hong Wen, et Xiaobing Shi. 2017. « The Histone Variant H3.3 in Transcriptional Regulation and Human Disease ». *Journal of Molecular Biology* 429(13):1934-45. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.019.
- Smet-Nocca, Caroline, Jean-Michel Wieruszkeski, Hélène Léger, Sebastian Eilebrecht, et Arndt Benecke. 2011. « SUMO-1 Regulates the Conformational Dynamics of Thymine-DNA Glycosylase Regulatory Domain and Competes with Its DNA Binding Activity ». *BMC Biochemistry* 12:4. doi: 10.1186/1471-2091-12-4.
- Sodroski, J., C. Rosen, F. Wong-Staal, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, S. Arya, R. C. Gallo, et W. A. Haseltine. 1985. « Trans-Acting Transcriptional Regulation of Human T-Cell Leukemia Virus Type III Long Terminal Repeat ». *Science (New York, N.Y.)* 227(4683):171-73. doi: 10.1126/science.2981427.
- Søgaard, Ole S., Mette E. Graversen, Steffen Leth, Rikke Olesen, Christel R. Brinkmann, Sara K. Nissen, Anne Sofie Kjaer, Mariane H. Schleimann, Paul W. Denton, William J. Hey-Cunningham, Kersten K. Koelsch, Giuseppe Pantaleo, Kim Krogsgaard, Maja Sommerfelt, Remi Fromentin, Nicolas Chomont, Thomas A. Rasmussen, Lars Østergaard, et Martin Tolstrup. 2015. « The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo ». *PLoS Pathogens* 11(9):e1005142. doi: 10.1371/journal.ppat.1005142.
- Solis, Mayra, Peyman Nakhaei, Mohammad Jalalirad, Judith Lacoste, Renée Douville, Meztli Arguello, Tiejun Zhao, Michael Laughrea, Mark A. Wainberg, et John Hiscott. 2011. « RIG-I-Mediated Antiviral

- Signaling Is Inhibited in HIV-1 Infection by a Protease-Mediated Sequestration of RIG-I ». *Journal of Virology* 85(3):1224-36. doi: 10.1128/JVI.01635-10.
- Song, Jae J., et Yong J. Lee. 2003. « Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 Signal in Daxx Trafficking and ASK1 Oligomerization ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(47):47245-52. doi: 10.1074/jbc.M213201200.
- Song, Jing, Linda K. Durrin, Thomas A. Wilkinson, Theodore G. Krontiris, et Yuan Chen. 2004. « Identification of a SUMO-Binding Motif That Recognizes SUMO-Modified Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(40):14373-78. doi: 10.1073/pnas.0403498101.
- Sorin, Masha, Jennifer Cano, Supratik Das, Sheeba Mathew, Xuhong Wu, Kelvin P. Davies, Xuanling Shi, S. W. Grace Cheng, David Ott, et Ganjam V. Kalpana. 2009. « Recruitment of a SAP18-HDAC1 Complex into HIV-1 Virions and Its Requirement for Viral Replication ». *PLoS Pathogens* 5(6):e1000463. doi: 10.1371/journal.ppat.1000463.
- Strack, Bettina, Arianna Calistri, Stewart Craig, Elena Popova, et Heinrich G. Göttlinger. 2003. « AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 P6 and EIAV P9 Functioning in Virus Budding ». *Cell* 114(6):689-99. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00653-6.
- Stremlau, Matthew, Christopher M. Owens, Michel J. Perron, Michael Kiessling, Patrick Autissier, et Joseph Sodroski. 2004. « The Cytoplasmic Body Component TRIM5alpha Restricts HIV-1 Infection in Old World Monkeys ». *Nature* 427(6977):848-53. doi: 10.1038/nature02343.
- Stremlau, Matthew, Michel Perron, Mark Lee, Yuan Li, Byeongwoon Song, Hassan Javanbakht, Felipe Diaz-Griffero, Donovan J. Anderson, Wesley I. Sundquist, et Joseph Sodroski. 2006. « Specific Recognition and Accelerated Uncoating of Retroviral Capsids by the TRIM5alpha Restriction Factor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(14):5514-19. doi: 10.1073/pnas.0509996103.
- Sun, Lijun, Jiaxi Wu, Fenghe Du, Xiang Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 339(6121):786-91. doi: 10.1126/science.1232458.
- Tada, Takuya, Yanzhao Zhang, Takayoshi Koyama, Minoru Tobiume, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Shoji Yamaoka, Hideaki Fujita, et Kenzo Tokunaga. 2015. « MARCH8 Inhibits HIV-1 Infection by Reducing Virion Incorporation of Envelope Glycoproteins ». *Nature Medicine* 21(12):1502-7. doi: 10.1038/nm.3956.
- Tanaka, Makoto, et Tetsu Kamitani. 2010. « Cytoplasmic Relocation of Daxx Induced by Ro52 and FLASH ». *Histochemistry and Cell Biology* 134(3):297-306. doi: 10.1007/s00418-010-0734-6.
- Tang, Jun, Shaobo Wu, Hongtu Liu, Rachael Stratt, Orr G. Barak, Ramin Shiekhhattar, David J. Picketts, et Xiaolu Yang. 2004. « A Novel Transcription Regulatory Complex Containing Death Domain-

Associated Protein and the ATR-X Syndrome Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(19):20369-77. doi: 10.1074/jbc.M401321200.

Tartour, Kevin, Romain Appourchaux, Julien Gaillard, Xuan-Nhi Nguyen, Stéphanie Durand, Jocelyn Turpin, Elodie Beaumont, Emmanuelle Roch, Gregory Berger, Renaud Mahieux, Denys Brand, Philippe Roingard, et Andrea Cimarelli. 2014. « IFITM Proteins Are Incorporated onto HIV-1 Virion Particles and Negatively Imprint Their Infectivity ». *Retrovirology* 11:103. doi: 10.1186/s12977-014-0103-y.

Tatham, Michael H., Ellis Jaffray, Owen A. Vaughan, Joana M. P. Desterro, Catherine H. Botting, James H. Naismith, et Ronald T. Hay. 2001. « Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 Are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9 ». *Journal of Biological Chemistry* 276(38):35368-74. doi: 10.1074/jbc.M104214200.

Tatham, Michael H., Suhkmann Kim, Ellis Jaffray, Jing Song, Yuan Chen, et Ronald T. Hay. 2005. « Unique Binding Interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 Reveal a Mechanism for SUMO Paralog Selection ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12(1):67-74. doi: 10.1038/nsmb878.

Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, et H. G. Göttlinger. 1994. « Functional Association of Cyclophilin A with HIV-1 Virions ». *Nature* 372(6504):363-65. doi: 10.1038/372363a0.

de Thé, H., C. Chomienne, M. Lanotte, L. Degos, et A. Dejean. 1990. « The t(15;17) Translocation of Acute Promyelocytic Leukaemia Fuses the Retinoic Acid Receptor Alpha Gene to a Novel Transcribed Locus ». *Nature* 347(6293):558-61. doi: 10.1038/347558a0.

Thomas, James A., David E. Ott, et Robert J. Gorelick. 2007. « Efficiency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Postentry Infection Processes: Evidence against Disproportionate Numbers of Defective Virions ». *Journal of Virology* 81(8):4367-70. doi: 10.1128/JVI.02357-06.

Torii, S., D. A. Egan, R. A. Evans, et J. C. Reed. 1999. « Human Daxx Regulates Fas-Induced Apoptosis from Nuclear PML Oncogenic Domains (PODs) ». *The EMBO Journal* 18(21):6037-49. doi: 10.1093/emboj/18.21.6037.

Tsai, Kevin, Nadezhda Thikmyanova, Jason A. Wojcechowskyj, Henri-Jacques Delecluse, et Paul M. Lieberman. 2011. « EBV Tegument Protein BNRF1 Disrupts DAXX-ATRAX to Activate Viral Early Gene Transcription ». *PLoS Pathogens* 7(11):e1002376. doi: 10.1371/journal.ppat.1002376.

Turelli, P., V. Doucas, E. Craig, B. Mangeat, N. Klages, R. Evans, G. Kalpana, et D. Trono. 2001. « Cytoplasmic Recruitment of INI1 and PML on Incoming HIV Preintegration Complexes: Interference with Early Steps of Viral Replication ». *Molecular Cell* 7(6):1245-54. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00255-6.

Usami, Yoshiko, Yuanfei Wu, et Heinrich G. Göttlinger. 2015. « SERINC3 and SERINC5 Restrict HIV-1 Infectivity and Are Counteracted by Nef ». *Nature* 526(7572):218-23. doi: 10.1038/nature15400.

- Valle-Casuso, Jose Carlos, Francesca Di Nunzio, Yang Yang, Natalia Reszka, Maritza Lienlaf, Nathalie Arhel, Patricio Perez, Abraham L. Brass, et Felipe Diaz-Griffero. 2012. « TNPO3 Is Required for HIV-1 Replication after Nuclear Import but Prior to Integration and Binds the HIV-1 Core ». *Journal of Virology* 86(10):5931-36. doi: 10.1128/JVI.00451-12.
- Van Damme, Ellen, Kris Laukens, Thanh Hai Dang, et Xaveer Van Ostade. 2010. « A Manually Curated Network of the PML Nuclear Body Interactome Reveals an Important Role for PML-NBs in SUMOylation Dynamics ». *International Journal of Biological Sciences* 6(1):51-67. doi: 10.7150/ijbs.6.51.
- Van Damme, Nanette, Daniel Goff, Chris Katsura, Rebecca L. Jorgenson, Richard Mitchell, Marc C. Johnson, Edward B. Stephens, et John Guatelli. 2008. « The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein ». *Cell Host & Microbe* 3(4):245-52. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.001.
- Vanhée-Brossollet, C., H. Thoreau, N. Serpente, L. D'Auriol, J. P. Lévy, et C. Vaquero. 1995. « A Natural Antisense RNA Derived from the HIV-1 Env Gene Encodes a Protein Which Is Recognized by Circulating Antibodies of HIV+ Individuals ». *Virology* 206(1):196-202. doi: 10.1016/s0042-6822(95)80034-4.
- Visseaux, Benoit, Florence Damond, Sophie Matheron, Diane Descamps, et Charlotte Charpentier. 2016. « Hiv-2 Molecular Epidemiology ». *Infection, Genetics and Evolution* 46:233-40. doi: 10.1016/j.meegid.2016.08.010.
- Volkman, Bianca, Sabine Wittmann, Justine Lagisquet, Janina Deutschmann, Kristin Eissmann, James J. Ross, Brigitte Biesinger, et Thomas Gramberg. 2020. « Human TRIM5 α Senses and Restricts LINE-1 Elements ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1922366117.
- Wang, Feng-Xiang, Jialing Huang, Hangxiang Zhang, Xinliang Ma, et Hui Zhang. 2008. « APOBEC3G Upregulation by Alpha Interferon Restricts Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Human Peripheral Plasmacytoid Dendritic Cells ». *The Journal of General Virology* 89(Pt 3):722-30. doi: 10.1099/vir.0.83530-0.
- Wang, Xiaoman, Yiyue Zhao, Jian Zhang, et Yong Chen. 2017. « Structural Basis for DAXX Interaction with ATRX ». *Protein & Cell* 8(10):767-71. doi: 10.1007/s13238-017-0462-y.
- Wethkamp, Nils, Helmut Hanenberg, Sarah Funke, Christoph V. Suschek, Wiebke Wetzel, Sebastian Heikau, Edgar Grinstein, Uwe Ramp, Rainer Engers, Helmut E. Gabbert, et Csaba Mahotka. 2011. « Daxx-Beta and Daxx-Gamma, Two Novel Splice Variants of the Transcriptional Co-Repressor Daxx ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(22):19576-88. doi: 10.1074/jbc.M110.196311.
- White, Tommy E., Alberto Brandariz-Nuñez, Jose Carlos Valle-Casuso, Sarah Amie, Laura Anh Nguyen, Baek Kim, Marina Tuzova, et Felipe Diaz-Griffero. 2013. « The Retroviral Restriction Ability of SAMHD1, but Not Its Deoxynucleotide Triphosphohydrolase Activity, Is Regulated by Phosphorylation ». *Cell Host & Microbe* 13(4):441-51. doi: 10.1016/j.chom.2013.03.005.

- Wilén, Craig B., John C. Tilton, et Robert W. Doms. 2012. « HIV: Cell Binding and Entry ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(8):a006866. doi: 10.1101/cshperspect.a006866.
- Woodhall, David L., Ian J. Groves, Matthew B. Reeves, Gavin Wilkinson, et John H. Sinclair. 2006. « Human Daxx-Mediated Repression of Human Cytomegalovirus Gene Expression Correlates with a Repressive Chromatin Structure around the Major Immediate Early Promoter ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(49):37652-60. doi: 10.1074/jbc.M604273200.
- Wu, Xiaolu, Jenny L. Anderson, Edward M. Campbell, Ajith M. Joseph, et Thomas J. Hope. 2006. « Proteasome Inhibitors Uncouple Rhesus TRIM5 α Restriction of HIV-1 Reverse Transcription and Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(19):7465-70. doi: 10.1073/pnas.0510483103.
- Xue, Yutong, Richard Gibbons, Zhijiang Yan, Dafeng Yang, Tarra L. McDowell, Salvatore Sechi, Jun Qin, Sharleen Zhou, Doug Higgs, et Weidong Wang. 2003. « The ATRX Syndrome Protein Forms a Chromatin-Remodeling Complex with Daxx and Localizes in Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19):10635-40. doi: 10.1073/pnas.1937626100.
- Yamauchi, Takayoshi, et Toshiro Moroishi. 2019. « Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System ». *Cells* 8(5). doi: 10.3390/cells8050398.
- Yang, Shen-Hsi, Alex Galanis, James Witty, et Andrew D. Sharrocks. 2006. « An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO ». *The EMBO Journal* 25(21):5083-93. doi: 10.1038/sj.emboj.7601383.
- Yang, Shen-Hsi, et Andrew D. Sharrocks. 2004. « SUMO Promotes HDAC-Mediated Transcriptional Repression ». *Molecular Cell* 13(4):611-17. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00060-7.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, et D. Baltimore. 1997. « Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis ». *Cell* 89(7):1067-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80294-9.
- Yang, Yang, Thomas Fricke, et Felipe Diaz-Griffero. 2013. « Inhibition of Reverse Transcriptase Activity Increases Stability of the HIV-1 Core ». *Journal of Virology* 87(1):683-87. doi: 10.1128/JVI.01228-12.
- Yang, Yang, Jeremy Luban, et Felipe Diaz-Griffero. 2014. « The Fate of HIV-1 Capsid: A Biochemical Assay for HIV-1 Uncoating ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1087:29-36. doi: 10.1007/978-1-62703-670-2_3.
- Yap, Melvyn W., Sébastien Nisole, Clare Lynch, et Jonathan P. Stoye. 2004. « Trim5 α Protein Restricts Both HIV-1 and Murine Leukemia Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(29):10786-91. doi: 10.1073/pnas.0402876101.
- Yu, Xianghui, Yunkai Yu, Bindong Liu, Kun Luo, Wei Kong, Panyong Mao, et Xiao-Fang Yu. 2003. « Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 302(5647):1056-60. doi: 10.1126/science.1089591.

- Zamborlini, Alessia, Audrey Coiffic, Guillaume Beauclair, Olivier Delelis, Joris Paris, Yashuiro Koh, Fabian Magne, Marie-Lou Giron, Joelle Tobaly-Tapiero, Eric Deprez, Stephane Emiliani, Alan Engelman, Hugues de Thé, et Ali Saïb. 2011. « Impairment of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase SUMOylation Correlates with an Early Replication Defect ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(23):21013-22. doi: 10.1074/jbc.M110.189274.
- Zennou, Véronique, David Perez-Caballero, Heinrich Göttlinger, et Paul D. Bieniasz. 2004. « APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles ». *Journal of Virology* 78(21):12058-61. doi: 10.1128/JVI.78.21.12058-12061.2004.
- Zhang, Fengwen, et Paul D. Bieniasz. 2020. « HIV-1 Vpr induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137 » édité par P. M. Ojala, W. I. Sundquist, V. Planelles, et M. Emerman. *eLife* 9:e55806. doi: 10.7554/eLife.55806.
- Zhang, H., G. Dornadula, J. Orenstein, et R. J. Pomerantz. 2000. « Morphologic Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions Secondary to Intravirion Reverse Transcription: Evidence Indicating That Reverse Transcription May Not Take Place within the Intact Viral Core ». *Journal of Human Virology* 3(3):165-72.
- Zhang, Hui, Bin Yang, Roger J. Pomerantz, Chune Zhang, Shyamala C. Arunachalam, et Ling Gao. 2003. « The Cytidine Deaminase CEM15 Induces Hypermutation in Newly Synthesized HIV-1 DNA ». *Nature* 424(6944):94-98. doi: 10.1038/nature01707.
- Zhao, Lisa Y., Jilin Liu, Gurjit S. Sidhu, Yuxin Niu, Yue Liu, Ruipeng Wang, et Daiqing Liao. 2004. « Negative Regulation of P53 Functions by Daxx and the Involvement of MDM2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(48):50566-79. doi: 10.1074/jbc.M406743200.
- Zheng, Yingfeng, Kallesh Danappa Jayappa, Zhujun Ao, Xiangguo Qiu, Ruey-Chyi Su, et Xiaojian Yao. 2019. « Noncovalent SUMO-Interaction Motifs in HIV Integrase Play Important Roles in SUMOylation, Cofactor Binding, and Virus Replication ». *Virology Journal* 16(1):42. doi: 10.1186/s12985-019-1134-8.
- Zhong, S., S. Müller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean, et P. P. Pandolfi. 2000. « Role of SUMO-1-Modified PML in Nuclear Body Formation ». *Blood* 95(9):2748-52.
- Zhu, Shanshan, Jacqueline Goeres, Katherine M. Sixt, Miklós Békés, Xiang-Dong Zhang, Guy S. Salvesen, et Michael J. Matunis. 2009. « Protection from Isopeptidase-Mediated Deconjugation Regulates Paralog-Selective Sumoylation of RanGAP1 ». *Molecular cell* 33(5):570-80. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.008.
- Zhu, Yiping, Guifang Chen, Fengxiang Lv, Xinlu Wang, Xin Ji, Yihui Xu, Jing Sun, Li Wu, Yong-Tang Zheng, et Guangxia Gao. 2011. « Zinc-Finger Antiviral Protein Inhibits HIV-1 Infection by Selectively Targeting Multiply Spliced Viral MRNAs for Degradation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):15834-39. doi: 10.1073/pnas.1101676108.

Zhu, Yiping, Xinlu Wang, Stephen P. Goff, et Guangxia Gao. 2012. « Translational Repression Precedes and Is Required for ZAP-Mediated MRNA Decay ». *The EMBO Journal* 31(21):4236-46. doi: 10.1038/emboj.2012.271.

ANNEXES

Annexe 1

Revue

Virologie

Virologie 2016, 20 (5):261-72

Daxx, un facteur de restriction virale à large spectre

Daxx, un facteur de restriction virale à large spectre

Sarah Maillet

Sébastien Nisole

Université Paris Descartes,

Unité Inserm UMR 1124,

45, rue des Saints-Pères,

75006 Paris, France

<sebastien.nisole@inserm.fr>

Centre d'études d'agents pathogènes

et biotechnologies pour la santé (CPBS)

CNRS FRE3689,

Université de Montpellier

1919, route de Mende

34293 Montpellier cedex 5, France

Résumé. Daxx est une protéine ubiquitaire, qui a tout d'abord été identifiée comme un ligand du récepteur Fas. Bien que la forme cytoplasmique de Daxx soit impliquée dans l'apoptose, la protéine s'est révélée être majoritairement nucléaire. Dans le noyau, Daxx est principalement associée à la protéine PML au sein des corps nucléaires PML (CN PML), des structures nucléaires dynamiques impliquées dans de nombreux processus cellulaires. La principale fonction de Daxx dans le noyau est celle d'un répresseur transcriptionnel, fonction qu'elle exerce en interagissant avec de multiples facteurs impliqués dans la transcription. Daxx, tout comme les autres protéines résidentes des CN PML, PML, mais aussi Sp100 et ATRX, est impliquée dans la défense antivirale. Elle est d'ailleurs la cible de nombreux virus qui vont soit la délocaliser, soit provoquer sa dégradation. La restriction virale imposée par Daxx a été particulièrement étudiée dans le cas des herpesvirus et des adénovirus, mais de récentes découvertes suggèrent que Daxx a également un rôle majeur dans la réplication des rétrovirus et notamment du VIH-1. Dans cette revue, nous résumons et discutons les différentes activités antivirales de Daxx et détaillons les stratégies que les virus ont développées pour y échapper.

Mots clés : Daxx, corps nucléaires PML, SUMOylation, répression transcriptionnelle, facteur de restriction

Abstract. Daxx is an ubiquitous protein that was first identified as a Fas-interacting protein. Although cytoplasmic Daxx is involved in apoptosis, it is predominantly a nuclear protein. In the nucleus, Daxx is mainly located within PML nuclear bodies (PML NBs), nuclear structures involved in many cellular processes. The main function of Daxx in the nucleus is transcriptional repression through interactions with multiple factors involved in transcription. Daxx, like other PML NB resident proteins, such as PML itself, but also Sp100 and ATRX, is involved in antiviral defense. In concordance with this, many viruses target Daxx to replicate. Daxx-induced viral restriction has been particularly studied in the case of herpesviruses and adenoviruses, but recent findings suggest that Daxx also has a major role in the replication of retroviruses, including HIV-1. In this review, we summarize and discuss the different antiviral activities of Daxx and detail the strategies that viruses have evolved to escape.

Key words: Daxx, PML nuclear bodies, SUMOylation, transcriptional repression, restriction factor

Daxx : localisation sub-cellulaire et principales fonctions

Daxx est une protéine de 740 acides-aminés exprimée de manière ubiquitaire, relativement mal caractérisée au

niveau structural [1] (figure 1). Elle a été découverte au cours d'un crible double-hybride en cellules de levure, comme interagissant avec le « domaine de mort » (*death domain*) du récepteur Fas [2] (figure 2). Elle en tire son nom : *Death domain-associated protein 6*. Suite à ce crible, Daxx a été logiquement impliquée dans l'apoptose induite par Fas et s'est notamment révélée faire le lien entre le récepteur de mort et la kinase JNK [2]. Malgré une activité

Tirés à part : S. Nisole

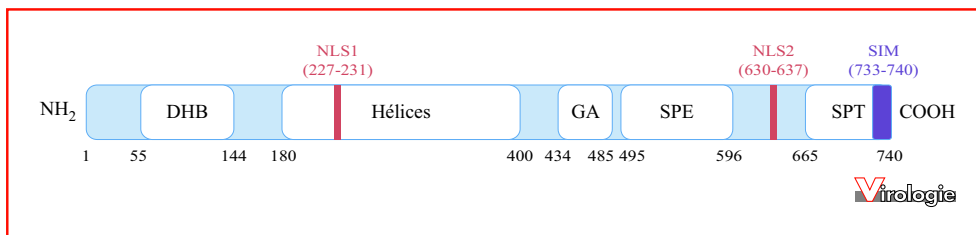


Figure 1. Structure de la protéine Daxx.

La protéine Daxx est relativement mal caractérisée d'un point de vue structural. Les principaux domaines de la protéine de 740 acides-aminés sont représentés, notamment les deux motifs de localisation nucléaire, NLS1 et NLS2, ainsi que le motif d'interaction avec SUMO, SIM. DHB, domaine en faisceau d'hélices (*Daxx Helix Bundle*) ; Hélices, région organisée en hélices, d'après les algorithmes de prédiction de la structure secondaire des protéines ; GA, région acide, riche en résidus Glu et Asp ; SPE, région riche en résidus Ser, Pro et Glu ; SPT, région riche en résidus Ser, Pro et Thr. Adapté de Escobar-Cabrera *et al.* [1].

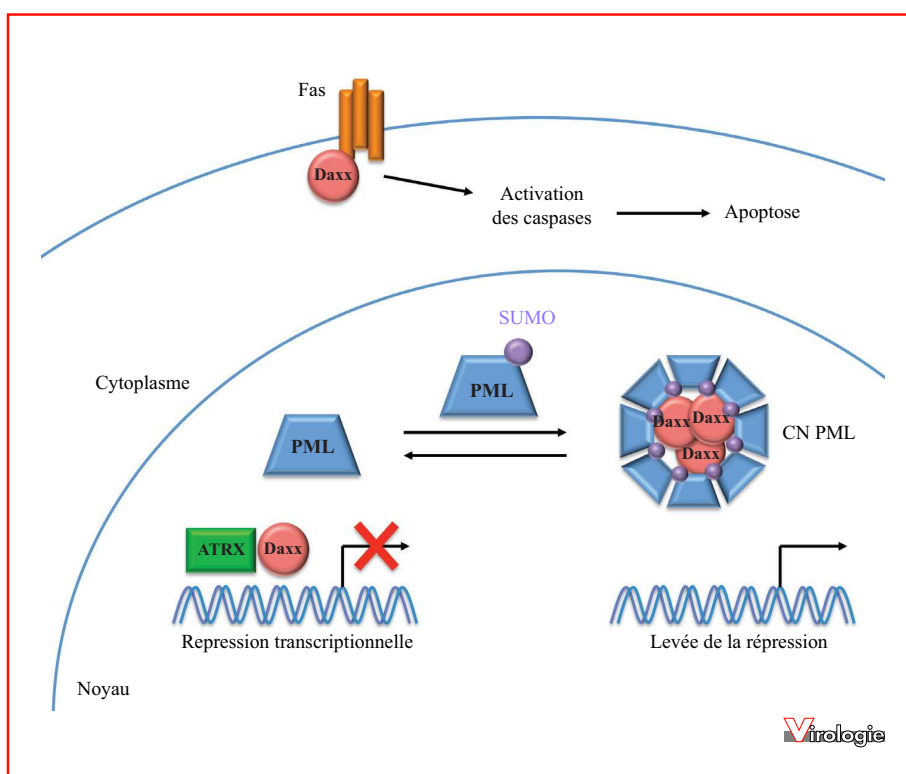


Figure 2. Principales localisations sub-cellulaires et fonctions des Daxx.

Dans le cytoplasme, Daxx a été identifiée comme un ligand de Fas. Dans le noyau, Daxx est principalement localisée au sein des CN PML, où elle est recrutée par la forme SUMOylée de la protéine PML. Lorsqu'elle n'interagit pas avec PML, Daxx est localisée au niveau de l'hétérochromatine où elle forme un complexe de répression de la transcription avec la protéine ATRX. La séquestration de Daxx par PML l'empêche d'exercer son activité de répresseur transcriptionnel.

de recherche intensive sur son implication dans l'apoptose, il n'est toujours pas réellement clair si Daxx est une protéine pro- ou anti-apoptotique [3]. La difficulté de répondre à cette question réside dans le fait que Daxx peut être impliquée dans ces deux mécanismes antagonistes selon le type cellulaire et la nature du stimulus.

Cependant, bien que Daxx se lie à Fas dans le cytoplasme, la protéine s'est rapidement révélée être majoritairement nucléaire. Daxx possède, en effet, deux motifs de localisation nucléaire (NLS), NLS1 (227-231) et NLS2 (630-637) [4] (*figure 1*). Dans le noyau, la principale fonction de Daxx est celle d'un répresseur transcriptionnel (*figure 2*). Le

mécanisme par lequel Daxx exerce son activité de répression est complexe et fait intervenir un très grand nombre de partenaires. Daxx interagit notamment avec de nombreux facteurs de transcription et réprime leur activité, comme Pax3, ETS1, E2F1, NF- κ B, les protéines de la famille p53, le récepteur des glucocorticoïdes, le récepteur des androgènes, Smad4, STAT3... (pour revue, voir [5]). En plus de réprimer la transcription *via* une interaction directe avec des facteurs de transcription, Daxx régule également la transcription par des mécanismes épigénétiques, en interagissant notamment avec les histones déacétylases (HDAC1 et HDAC2), les histones acétylées et la protéine DEK. Daxx participe ainsi à la répression transcriptionnelle médiée par la déacétylation des histones, le remodelage de la chromatine, mais aussi la méthylation de l'ADN, *via* son interaction avec des ADN méthyltransférases (DNMTs) (pour revue, voir [5]). Enfin, Daxx forme un complexe avec une protéine de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF nommée ATRX (*Alpha-thalassemia mental retardation syndrome, X-linked*) au niveau de l'hétérochromatine centromérique. Ce complexe Daxx-ATRX est responsable de l'incorporation d'un variant de l'histone H3 désigné H3.3 [6-8]. Tandis que la protéine chaperon HIRA permet d'incorporer l'histone H3.3 au niveau de régions transcriptionnellement actives, Daxx et ATRX induisent son incorporation au niveau de la chromatine péri-centrique et télomérique et sont associées à la répression transcriptionnelle de ces régions [6-8]. D'un point de vue mécanistique, c'est Daxx qui recrute l'histone H3.3, sous la forme d'un dimère histone H3.3/histone H4 [9].

De façon *a priori* surprenante, malgré ces rôles de Daxx dans la répression transcriptionnelle, sa principale localisation nucléaire n'est pas associée à la chromatine, mais au sein de structures multiprotéiques désignées corps nucléaires (CN PML), PODs (*PML oncogenic domains*) ou ND10 (*Nuclear domain 10*) [10, 11] (*figure 2*). Daxx localise au sein de ces corps *via* une interaction avec la protéine de la leucémie promyélocytaire, ou PML (*ProMyelocytic Leukemia*) [10, 11]. PML est la protéine responsable de la formation de ces corps nucléaires. Elle appartient à la famille TRIM (*TRIPartite Motif*), une famille de protéines caractérisées par une architecture commune, composée de N- en C-terminal de 3 domaines conservés : un domaine RING, une ou deux boîtes B (*B-box* en anglais) et d'un domaine « *coiled-coil* » [12]. PML recrute un grand nombre de protéines au sein de ces corps nucléaires. Parmi elles, certaines protéines y résident de façon permanente, tandis que d'autres y sont recrutées de façon transitoire, en fonction de divers stimuli. Parmi les rares protéines résidentes des CN PML, on trouve, outre PML, les protéines Daxx, Sp100 et ATRX. Les CN PML sont des structures dynamiques impliquées dans de nombreuses activités cellulaires

comme l'apoptose, l'expression génique, la réparation de l'ADN et la sénescence [13]. Une autre fonction des CN PML qui a également émergé est celle de la défense antivirale [14]. Les protéines constitutives des CN PML sont d'ailleurs des médiateurs de l'activité antivirale de l'interféron, qui induit notamment l'expression des gènes *PML*, *Sp100* et dans une moindre mesure, *Daxx*. De nombreux virus, principalement à ADN, ciblent les CN PML et les désagrègent, afin de permettre leur réplication [15]. PML, Sp100 et Daxx possèdent en effet, indépendamment ou de manière conjuguée, des activités antivirales intrinsèques à large spectre [16-18].

Daxx : le rôle clé de *Small Ubiquitin like Modifier*

Une autre protéine qui joue un rôle clé dans la formation et la fonction des CN PML est SUMO (*Small ubiquitin-like Modifier*). Les protéines SUMO sont de petites protéines apparentées à l'ubiquitine qui sont liées de façon covalente au niveau de résidus lysines des protéines cibles [19]. Cette modification post-traductionnelle des protéines peut moduler leur localisation sub-cellulaire, leur stabilité et leurs fonctions. Tout comme l'ubiquitination, le processus de SUMOylation fait intervenir une cascade enzymatique impliquant l'enzyme d'activation E1 (SAE1/SAE2), l'enzyme de conjugaison E2 (Ubc9) et des enzymes E3 ligases, qui ne sont pas essentielles mais favorisent la SUMOylation des protéines substrats. Tout comme l'ubiquitination, la conjugaison à SUMO est un processus réversible, puisque les protéines SUMO peuvent être clivées par des enzymes de la famille SENP (*sentrin protease*). PML et la plupart des protéines associées à PML sont SUMOylées. C'est d'ailleurs la conjugaison de PML à SUMO qui permet la constitution des CN PML et le recrutement d'autres protéines, comme Daxx. Daxx est en effet recrutée dans les CN PML *via* son interaction avec PML SUMOylée (*figure 2*). En l'absence de PML ou si PML est désSUMOylée, Daxx est alors principalement localisée dans le nucléoplasme et sur l'hétérochromatine [10]. PML séquestre donc Daxx dans les CN PML, l'empêchant ainsi d'exercer ses fonctions de répresseur transcriptionnel [20] (*figure 2*). Dans le cas de Daxx, les CN PML constitueraient donc un lieu de stockage de la protéine afin de réguler l'homéostasie cellulaire. Cette répartition de la forme nucléaire de Daxx entre CN PML et hétérochromatine peut être modulée par différents facteurs, comme le stress, les infections virales, l'interféron ou le cycle cellulaire. Il a en effet pu être observé que Daxx se dissociait des CN PML en fin de phase S pour interagir avec ATRX au

sein de l'hétérochromatine, et s'y relocalisait en phase G2 [21]. Ces résultats suggèrent donc que la répression transcriptionnelle par le complexe Daxx/ATRX serait régulée en fonction du cycle cellulaire.

Outre PML, il a pu être montré que l'immense majorité des nombreux partenaires de Daxx sont SUMOylés et que Daxx interagit avec eux *via* un motif d'interaction avec SUMO (SIM [*SUMO interacting Motif*]) [22]. Ce motif 733IVLSDS_{740} (figure 1) permet à Daxx d'interagir de façon noncovalente avec SUMO mais aussi et surtout avec les protéines SUMOylées. La mutation du SIM de Daxx l'empêche ainsi d'être recrutée au niveau des CN PML. Cependant, bien que libérés des CN PML, les mutants de Daxx dépourvus de SIM sont incapables de réprimer la transcription, indiquant que les fonctions transcriptionnelles de Daxx sont également dépendantes de sa capacité à interagir avec des protéines SUMOylées. De façon intéressante, Daxx peut également être conjuguée de façon covalente à SUMO au niveau de son extrémité C-terminale et cette SUMOylation de Daxx dépend également de la présence du SIM [22]. La présence d'un motif SIM explique également la pléthore d'interactants de Daxx qui ont été identifiés, l'immense majorité d'entre eux étant SUMOylés [22]. C'est notamment le cas des nombreux facteurs de transcription précédemment évoqués avec qui Daxx interagit. La SUMOylation des facteurs de transcription est d'ailleurs associée dans la plupart des cas à leur répression [19].

Daxx, facteur de restriction

Si les virus trouvent dans leurs cellules-cibles tous les constituants nécessaires à leur réplication, ils doivent également échapper à l'action de protéines possédant une activité antivirale. Ces protéines sont aujourd'hui désignées sous le terme de facteurs de restriction, depuis la découverte d'un grand nombre de protéines cellulaires contrecarrant l'infection par le VIH-1 [23]. Le terme de facteur de restriction est maintenant utilisé pour décrire l'ensemble des facteurs qui confèrent aux cellules une immunité dite « intrinsèque ». Bien que la plupart de ces facteurs soient exprimés dans les cellules de manière constitutive, leur expression est souvent sensiblement augmentée par l'interféron, amplifiant ainsi leur activité. Nous résumons et discutons dans cette revue plus de 10 ans de recherche qui ont permis de mettre en évidence un rôle central de Daxx dans la défense antivirale. L'abondante littérature décrivant l'activité antivirale de Daxx relate majoritairement sa capacité à inhiber la transcription des virus à ADN dans le noyau. En effet, au cours de l'infection par de nombreux virus à ADN, comme les herpèsvirus, les adénovirus ou les

papillomavirus, les génomes viraux sont localisés à proximité des CN PML [24]. Le fait que ces virus parviennent à transcrire leur génome et à initier leur réplication au sein de ces complexes suggère que ces virus ont réussi à mettre en place des stratégies pour échapper à ces défenses cellulaires, voire à les exploiter. Des études plus récentes ont également révélé des activités anti-rétrovirales de Daxx, qui serait notamment impliquée dans la répression épigénétique de l'expression des rétrovirus.

Toutes les activités nucléaires de Daxx sont étroitement liées à PML ainsi qu'aux autres protéines associées au CN PML. En effet, toutes ces protéines interagissent ensemble, co-localisent au niveau des mêmes structures, sont SUMOylées, interagissent avec les protéines SUMOylées *via* des SIM, sont induites par l'interféron et participent à des processus communs. Il est donc parfois difficile d'attribuer une activité donnée à l'une ou l'autre de ces protéines constitutives des CN PML, tant leurs destins sont liés.

Daxx et les herpèsvirus

La plupart des études mettant en lumière l'activité antivirale de Daxx conférée par son activité de répresseur transcriptionnel ont été réalisées sur les herpèsvirus, des virus comprenant d'importants pathogènes humains comme le virus herpes simplex de type I (HSV-1), le cytomegalovirus humain (HCMV), le virus Epstein-Barr (EBV) et le virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8). Ces virus enveloppés possèdent un génome ADN double-brin encapsidé dans une capside icosahédrique, entourée elle-même d'une seconde couche de protéines, le tégment. Après fixation des glycoprotéines de surface à leurs récepteurs, la nucléocapside entourée du tégment est libérée dans le cytoplasme et s'achemine alors vers le noyau, transit au cours duquel les protéines de tégment sont peu à peu dissociées de la nucléocapside. Une fois dans le noyau, la transcription des gènes immédiats précoces (IE, pour *Immediate Early*) doit être initiée afin que le virus réalise un cycle de réplication productif. C'est au cours de cette transcription très précoce qu'intervient l'activité antivirale de Daxx et des autres protéines associées au CN PML. Cette répression transcriptionnelle imposée par Daxx est systématiquement contrecarrée par des protéines virales.

Dans le cas du HCMV par exemple, l'extinction de l'expression de Daxx augmente la synthèse des ARN et des protéines immédiates précoces. Cette augmentation de la transcription est corrélée à l'association de marqueurs de chromatine transcriptionnellement active au niveau du promoteur majeur immédiat précoce [25]. À l'inverse, la surexpression de Daxx réprime l'expression des gènes immédiats précoces, confirmant le fait que Daxx exerce

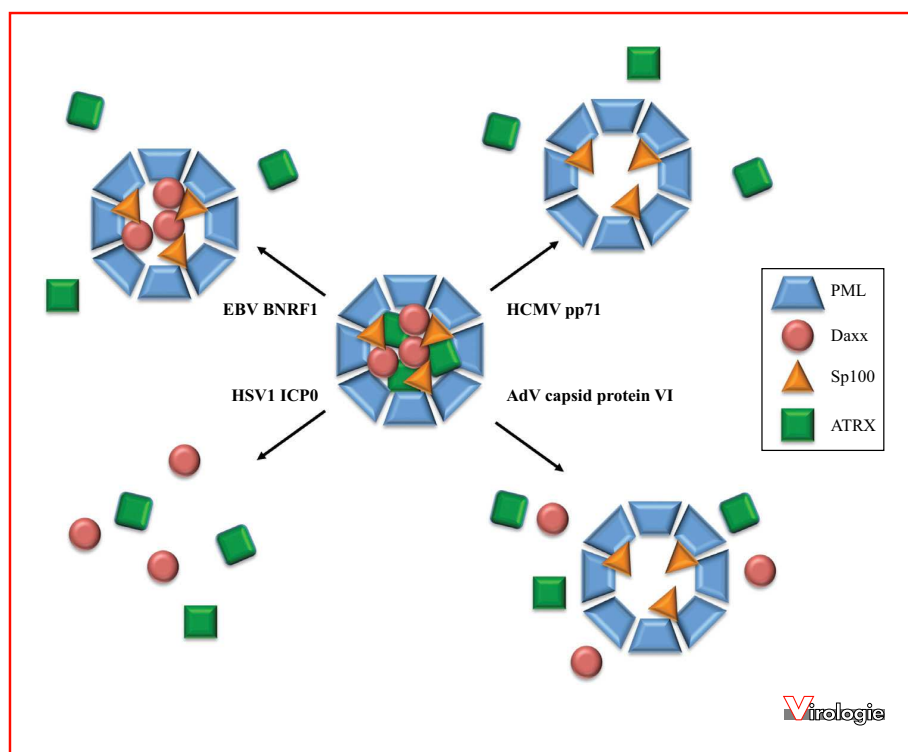


Figure 3. Désorganisation des CN PML par des protéines virales.

Ce schéma illustre des exemples de stratégies utilisées par les virus à ADN pour délocaliser les protéines Daxx et/ou ATRX hors des CN PML afin d'échapper à leur activité antivirale. La protéine BNRF1 d'EBV interagit avec Daxx et l'empêche de recruter ATRX au sein des CN PML. La protéine pp71 de HCMV induit quant à elle la dégradation de Daxx et la délocalisation d'ATRX. La protéine de capsid VI de l'adénovirus délocalise Daxx des CN PML, entraînant vraisemblablement une dispersion concomitante d'ATRX. Enfin, la protéine ICP0 codée par HSV-1 provoque une désagrégation complète des CN PML via la dégradation de PML et Sp100.

une répression transcriptionnelle du virus [25]. La protéine virale qui permet de neutraliser cette activité répressive de Daxx est la phosphoprotéine de tégument pp71 [26, 27]. Cette phosphoprotéine est délivrée par les particules virales entrantes, interagit avec Daxx et provoque sa dégradation. Cette dégradation de Daxx conduit à la dispersion d'ATRX hors des CN PML et permet ainsi la transcription des gènes très précoces [28, 29] (figure 3). L'une des principales fonctions de pp71 serait donc de provoquer la dégradation de Daxx, comme le suggère le fait que la répression de la transcription des gènes précoces immédiats de virus mutants n'exprimant pas pp71 puisse être levée par déplétion de Daxx [28]. Une autre protéine virale, nommée IE1 ou IE72, prend alors rapidement le relais de pp71, au cours des premières heures de l'infection par le HCMV. IE72 localise au niveau des CN PML via une interaction directe avec PML et désagrège ces corps [30, 31]. De plus, IE72 est capable d'interagir avec Daxx et empêche sa fixation au promoteur de LUNA (*latency unique natural antigen*), une protéine virale importante pour l'entrée en latence et la réactivation

du virus [32]. En l'absence d'IE72, Daxx peut en effet inhiber la transcription du gène codant LUNA en se fixant à son promoteur [32].

De façon similaire à HCMV, la transcription précoce immédiate d'EBV est réprimée par Daxx et ATRX. C'est la protéine majeure du tégument, BNRF1 (appelée aussi Zta) qui permet de contrecarrer cette répression transcriptionnelle. Délivrée par les virus entrants, BNRF1 se lie directement à Daxx au sein des CN PML et provoque le désassemblage des complexes de remodelage de la chromatine Daxx-ATRAX [33] (figure 3). Il est intéressant de noter que, dans le cas d'EBV, l'extinction de Daxx ou d'ATRAX suffit à réactiver un virus latent [33].

Tout comme EBV, KSHV peut initier un cycle lytique ou entrer en latence. Une abondante vascularisation et une perméabilité accrue des vaisseaux sont les principales caractéristiques histologiques du sarcome de Kaposi, une tumeur régulée par les cytokines induite par KSHV. Cette vascularisation accrue est due à l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF [*vascular*

endothelial growth factor]). Daxx exerce son activité anti-virale en inhibant l'expression du gène codant le récepteur au VEGF via l'inhibition du facteur de transcription ETS1 [34]. Cette activité de Daxx est contrecarrée par la protéine LANA (*latency-associated nuclear antigen*). LANA est une protéine multifonctionnelle requise notamment pour la maintenance de l'ADN viral sous forme d'épisome pendant la latence du virus. LANA interagit directement avec Daxx et empêche son interaction avec ETS1, permettant ainsi l'expression du récepteur au VEGF [34].

Par ailleurs, une autre protéine codée par KSHV, la protéine de tégument K-bZIP, a été identifiée comme un analogue structural de BRF1. Comme elle, K-bZIP cible les CN PML au cours de l'infection. Cependant, BK-bZIP n'altère pas la morphologie des CN PML et aucune association fonctionnelle entre K-bZIP et Daxx ou ATRX n'a été décrite. Pourtant, l'infection par le KSHV est associée à une disparition d'ATRX et à une délocalisation de Daxx hors des CN PML [35]. La protéine responsable de ce remaniement n'est donc pas K-bZIP mais une autre protéine de tégument, ORF75 [35]. Le fait que l'extinction de PML, Sp100 ou Daxx augmente le taux d'infection de fibroblastes humains par KSHV est en accord avec une activité répressive des protéines associées aux CN PML, contrecarrée par LANA [35].

Dans le cas de l'infection par HSV-1, l'activation du cycle lytique et l'expression des protéines très précoces requièrent VP16, une protéine virale délivrée par les virus entrants qui permet le recrutement des composants de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs IE [36]. L'activation de la transcription immédiate précoce induit l'expression de la protéine ICP0, une protéine capable de contrecarrer l'activité anti-virale des protéines associées aux CN PML. En effet, un virus HSV-1 provoque une désagrégation des CN PML tandis qu'un mutant dénué d'ICP0 en est incapable [37]. De plus, des virus n'exprimant pas ICP0 sont déficients dans leur capacité à établir un cycle lytique, tandis que la déplétion de PML, Daxx et Sp100 restaure partiellement leur capacité à se répliquer [38]. Très rapidement après l'infection, les protéines PML, Sp100, Daxx et ATRX sont recrutées au niveau des génomes viraux [39, 40]. Alors que la formation de ces corps est aisément détectable dans le cas d'une infection par un virus mutant dépourvu d'ICP0, cette redistribution des protéines constitutives des CN PML ne peut être observée que de façon transitoire dans le cas de virus sauvages. La protéine ICP0 provoque une rapide déstructuration de ces corps associés aux génomes viraux. Contrairement à pp71 ou BRF1, ICP0 n'agit pas directement sur Daxx, mais provoque une dégradation de PML et de Sp100, conduisant à une destruction des CN PML et à une dispersion de Daxx et d'ATRX [41, 42] (*figure 3*).

La dégradation de PML et Sp100 induite par ICP0 est dépendante de son domaine RING, doté d'une activité E3 ubiquitine-ligase.

Tous ces exemples illustrent les relations intimes et complexes que les herpèsvirus entretiennent avec les constituants des CN PML et avec Daxx en particulier. La compréhension de ces relations n'en est encore qu'à ses balbutiements, comme en témoigne le résultat d'un crible visant à identifier les protéines virales dont l'expression altère l'intégrité des CN PML : parmi les 93 protéines de HSV-1, HCMV et EBV criblées, 19 se sont révélées capables d'induire une déstructuration des CN PML tandis que 5 autres localisent au sein de ces corps et en modifie la morphologie [43]. Outre la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu, il est également difficile d'appréhender la véritable relation que les herpèsvirus entretiennent avec ces protéines. En effet, le fait qu'elles parviennent à réprimer leur transcription n'implique pas nécessairement que l'impact de Daxx, PML, Sp100 ou ATRX soit négatif sur ces virus. En effet, l'une des caractéristiques des herpèsvirus est leur capacité à entrer dans un état de latence. Les virus « endormis » peuvent alors persister dans leur hôte et être éventuellement réactivés par différents stimuli. Il est vraisemblable que les herpèsvirus se servent des protéines résidentes des CN PML à cette fin. Il a par exemple été montré que l'établissement d'un état de latence de HCMV dans des cellules CD34+ était associé à une rétention cytoplasmique de pp71, empêchant ainsi la dégradation de Daxx et la levée de la répression transcriptionnelle [44].

Daxx et les adénovirus

Le deuxième exemple de virus soumis à la répression transcriptionnelle imposée par Daxx est l'adénovirus. Les adénovirus sont de petits virus à ADN double-brin, non enveloppés, à capsidie icosaédrique. Cette capsidie, dont la principale protéine structurale est l'hexon, est stabilisée par plusieurs protéines mineures, comme la protéine VI. Le virus pénètre dans la cellule par endocytose et est libéré dans le cytosol. Au cours de sa progression vers le noyau, la nucléocapsidie subit un désassemblage progressif avant de s'arrimer aux pores nucléaires. La protéine VI qui contient des sites d'import (NLS) et d'export (NES) nucléaire, permet la translocation des nucléocapsides, en connectant la protéine d'hexon à la machinerie d'import nucléaire [45]. Une fois dans le noyau, l'ADN viral reste sous forme d'épisomes et débute sa transcription. La région E1A est la première unité de transcription activée suite à l'infection, soit l'équivalent des protéines IE des herpèsvirus. La

protéine E1A est cruciale pour la suite du cycle réplcatif, puisqu'elle induit l'entrée de la cellule infectée en phase S et joue le rôle de transactivateur en permettant une transcription efficace des autres unités de transcription précoce. Daxx, comme dans le cas du cytomégalo virus, réprime les promoteurs précoces du génome de l'adénovirus. C'est la protéine de capsid VI délivrée par les virus entrants qui permet d'initier cette transcription virale en contrecarrant la répression imposée par Daxx [46]. La protéine de capsid VI s'est en effet révélée nécessaire pour permettre l'initiation de la transcription en activant le promoteur E1A, induisant ainsi l'expression initiale du transactivateur viral. Contrairement à pp71, la protéine de capsid VI n'induit pas la dégradation de Daxx, mais provoque son exclusion des CN PML et sa translocation cytoplasmique [46] (figure 3). Une fois la transcription initiée et les protéines précoces synthétisées, une autre protéine virale provoque alors la dégradation de Daxx par le protéasome : la protéine E1B-55K [47]. Alors que E1B-55K est connue pour induire la dégradation de nombreuses protéines cellulaires, comme p53, MreI, l'ADN ligase IV ou l'intégrine $\alpha 3$ via son interaction avec la protéine virale E4orf6, la dégradation de Daxx est indépendante d'E4orf6 et ne dépend que de E1B-55K [48]. L'adénovirus cible donc Daxx via deux protéines distinctes afin de contrecarrer son activité antivirale imposée au niveau de deux étapes de son cycle de réplication.

Daxx et les papillomavirus

Tout comme les adénovirus, les papillomavirus humains (HPV), qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* sont de petits virus à ADN non enveloppés. Les HPV infectent spécifiquement les cellules épithéliales de la peau ou des muqueuses. Tandis qu'ils n'infectent que les cellules de la lame basale, leur réplication nécessite la différenciation des cellules en kératinocytes. Les particules virales de HPV sont constituées de deux protéines structurales : la protéine majeure de capsid, L1, et la protéine mineure, L2. Après son entrée dans le noyau, la protéine L2 s'associe aux CN PML et les réorganise [49]. Cependant, la réorganisation des CN PML induite par la protéine L2 est très différente de ce qui peut être observé dans le cas des herpèsvirus ou des adénovirus. En effet, L2 provoque une accumulation de Daxx dans les CN PML, tandis qu'elle en exclut Sp100. La protéine PML, quant à elle, ne semble pas affectée par la protéine virale [49]. Si cette réorganisation des CN PML semble atypique, c'est en réalité que les HPV représentent un cas particulier. En effet, Daxx et PML ont été décrites comme des facteurs favorisant la réplication virale, tandis que Sp100 est le seul constituant des CN PML identifié comme facteur de restriction dans le cas

des HPV [50, 51]. Il est cependant à noter que le rôle des protéines des CN PML a été très peu étudié dans le cas de HPV en comparaison de l'engouement qu'ont suscité ces recherches dans le cas des herpèsvirus et des adénovirus. Ainsi le rôle exact de Daxx dans le cadre de l'infection par HPV mériterait-il d'être plus amplement investigué.

Malgré ces surprenantes données suggérant un rôle proviral de Daxx au cours de l'infection par HPV, il est important de préciser que la protéine L2 de HPV présente en réalité des analogies évidentes avec les protéines pp71 de HCMV ou VI de l'adénovirus. Il a en effet été démontré que ces 3 protéines sont interchangeable. Ainsi, la transcription de l'adénovirus peut être induite indifféremment par la protéine VI, par pp71 ou par L2 [46]. À l'inverse, la protéine de capsid VI est capable d'initier la transcription du CMV [46]. Ces observations illustrent le fait que tous ces virus qui ont pour point commun de devoir se répliquer dans le noyau ont dû développer des stratégies distinctes pour parvenir à une même fin : empêcher la protéine Daxx de former un complexe de répression de la transcription au niveau du promoteur viral.

Daxx et les rétrovirus

Les rétrovirus constituent une famille de virus enveloppés, dont le génome est constitué de 2 copies d'ARN simple-brin de polarité positive. Une fois les capsides virales délivrées dans le cytoplasme de la cellule-cible, la rétro-transcriptase (RT) catalyse la rétro-transcription du génome ARN en ADN double-brin, le provirus. Cet ADN proviral va alors être transporté vers le noyau et s'y intégrer. Cette étape d'intégration est catalysée par une autre enzyme virale, l'intégrase (IN). Cependant, l'intégration du provirus n'est pas synonyme de son expression. En effet, une répression transcriptionnelle par des mécanismes épigénétiques est souvent observée. Cette répression peut être illustrée par plusieurs observations, comme l'extinction de l'expression rétrovirale dans les cellules souches embryonnaires [52, 53], l'extinction progressive de l'expression de transgènes introduits par des vecteurs rétroviraux [54], l'extinction de l'expression des rétrovirus endogènes [55] ou la latence [56]. Cette extinction épigénétique de l'expression rétrovirale est due à une méthylation de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG (5MeCpG) et/ou à des modifications post-traductionnelles des histones, entraînant une extinction transcriptionnelle. La méthylation de l'ADN est catalysée par des ADN méthyltransférases (DNMTs). Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent comprendre l'acétylation, la phosphorylation et la mono-, di- ou tri-méthylation et font notamment intervenir des histones acétyltransférases (HATs) et des histones méthyltransférases (HMTs). Les modifications associées

à une transcription active comprennent l'acétylation des histones H3 et H4 et la di- ou tri-méthylation de H3K4, tandis que les modifications associées à une répression transcriptionnelle incluent la triméthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 (H3K9me3) ou 27 (H3K27me3).

Ces mécanismes épigénétiques ne sont pas spécifiques des infections rétrovirales mais jouent notamment des rôles importants durant le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

Le fait que parmi les partenaires protéiques de Daxx figurent des histones déacetylases (HDAC) a rapidement suggéré que Daxx pourrait recruter ces enzymes pour réprimer la transcription *via* une déacétylation des histones et une condensation de la chromatine [20, 57] (*figure 4*). La preuve de l'implication de Daxx dans la répression épigénétique a été apportée par des études conduites sur un rétrovirus, le virus du sarcome aviaire, ASV [58]. Partant du constat que l'infection de cellules de mammifères avec ASV conduisait à une extinction épigénétique du provirus, les auteurs ont montré que Daxx s'associait à l'intégrase d'ASV et favorisait le recrutement d'HDAC au niveau du provirus, entraînant une répression de l'expression du promoteur viral (LTR [*Long Terminal Repeat*]) [58]. En accord avec le mécanisme proposé, la répression transcriptionnelle est levée par extinction de Daxx, de HDAC1 ou par des inhibiteurs de HDAC [59]. De plus, les auteurs ont pu démontrer que Daxx était également responsable de la méthylation de l'ADN viral, *via* son interaction avec des DNMTs [59]. Ces travaux démontrent donc que Daxx est non seulement capable de détecter une infection rétrovirale mais également de déclencher une répression épigénétique rapide et complète du provirus intégré, en induisant la méthylation de l'ADN viral et une modification des histones associées (*figure 4*). Une observation similaire a également été rapportée dans le cas d'un vecteur lentiviral dérivé de VIH-1, relatant une interaction de Daxx avec l'intégrase et une inhibition de l'expression du transgène qui peut être levée par extinction de l'expression de Daxx ou par des inhibiteurs de HDACs. Cette étude n'a cependant pas été confirmée jusqu'à présent [60].

Plus récemment, une autre étude a quant à elle impliqué Daxx dans l'extinction de l'expression des rétrovirus endogènes [61]. Cette étude met en évidence un verrouillage de l'expression des rétrovirus endogènes murins IAP et MusD dans les cellules souches embryonnaires par l'incorporation de l'histone H3.3 par un complexe mettant en jeu Daxx et ATRX, protéines chaperons de H3.3, et KAP1 (*KRAB-associated protein 1*, également appelée TRIM28). Cette incorporation de l'histone H3.3 est suivie par la méthylation des histones H3K9me3 par l'histone méthyltransferase ESET, entraînant une répression transcriptionnelle du rétrovirus [61].

Daxx semble donc avoir un rôle essentiel dans l'extinction épigénétique de l'expression des rétrovirus endogènes et pourrait également être impliquée dans la latence de rétrovirus exogènes, comme le VIH-1. En effet, des signatures épigénétiques H3K9me3 sont également retrouvées au niveau de provirus VIH-1 latents [62]. De plus, ces provirus latents sont localisés à proximité immédiate des CN PML, une proximité corrélée à la répression de leur transcription. De façon intéressante, la désagrégation des CN PML par extinction de l'expression de PML conduit à une forte réactivation de l'expression de virus latents [62]. Il est à noter que les auteurs de cette étude ont pu détecter la présence de PML, mais pas de Daxx, au niveau du LTR des provirus VIH-1 latents ainsi que des régions réprimées en aval [62]. Il serait néanmoins intéressant d'évaluer la contribution de Daxx dans cette répression épigénétique.

Outre son rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des génomes rétroviraux qui se fait peu à peu plus clair, nous avons récemment décrit une autre activité anti-rétrovirale non pas nucléaire, mais cytoplasmique [63]. Daxx est en effet capable d'interférer avec la rétrotranscription de rétrovirus exogènes comme VIH-1, MLV ou SIVmac mais aussi avec la rétro-transposition des rétrovirus endogènes IAP et MusD (*figure 4*). Le mécanisme de cette activité anti-rétrovirale de la forme cytoplasmique de Daxx est cependant inconnu. Il requiert vraisemblablement une interaction directe de Daxx avec un composant viral, comme le suggère le fait que Daxx co-localise avec les capsides de VIH-1 dans le cytoplasme des cellules infectées. Étant donné que l'immense majorité des partenaires de Daxx est SUMOylée, les candidats possibles sont donc à rechercher parmi les protéines virales sujettes à cette modification post-traductionnelle. Dans le cas du VIH-1, deux protéines ont été décrites comme étant conjuguées à SUMO : l'intégrase [64] et p6 [65].

Il est intéressant de noter que c'est PML qui avait initialement été suspectée posséder une activité inhibitrice lors des phases précoces de la réplication du VIH-1 [66]. L'extinction de l'expression de PML permet en effet une meilleure efficacité de transduction de vecteurs dérivés du VIH-1 [63, 66]. Cette observation peut être expliquée par le fait que l'extinction de l'expression de PML entraîne également une diminution importante de l'expression de Daxx, vraisemblablement due au fait que PML protège Daxx d'une dégradation par le protéasome [47, 63]. Il est donc important de prendre en compte la corrélation entre l'expression de ces deux protéines, afin de ne pas attribuer à PML des activités qui sont en fait portées par Daxx.

Bien que plus parcellaire que dans le cas des herpèsvirus ou des adénovirus, les récentes observations liant Daxx et rétrovirus laissent entrevoir un rôle central de cette

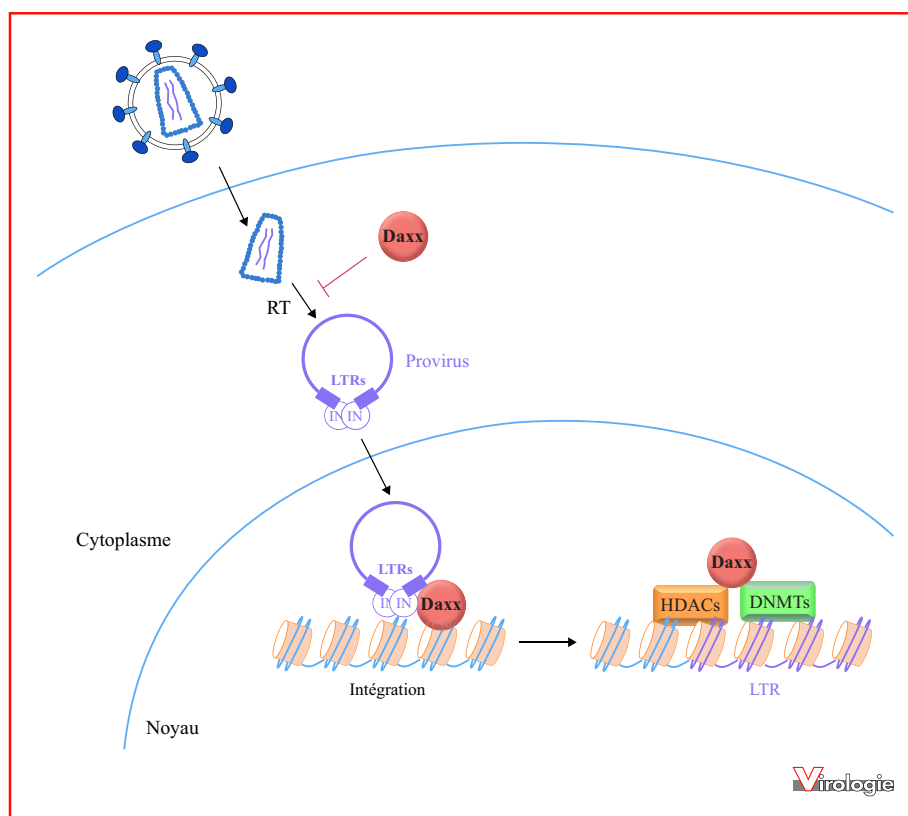


Figure 4. Inhibition de la réplication des rétrovirus par Daxx.

Cette figure illustre de manière schématique les étapes précoces de la réplication d'un rétrovirus, depuis l'entrée du virus jusqu'à l'intégration de l'ADN proviral. Dans le cytoplasme, Daxx inhibe l'étape de rétro-transcription (RT). Dans le noyau, Daxx interagit avec l'intégrase (IN) du virus et recrute des enzymes cellulaires impliquées dans les mécanismes épigénétiques, comme des ADN méthyltransférases (DNMTs) et des histones déacétylases (HDACs). Ce recrutement aboutit à une répression épigénétique du promoteur viral (LTR [Long terminal repeat]). Adapté de Shalginskikh *et al.* [59].

protéine cellulaire dans la restriction cellulaire à l'encontre des infections rétrovirales. Nul doute que cette littérature s'étoffera rapidement.

Daxx et les autres virus

Daxx a également été identifiée comme un ligand de la protéine de capsid (DEN-C) du virus de la dengue (DENV) [67]. DENV est un virus à ARN simple-brin de polarité positive, appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Ce virus induit une apoptose des cellules hépatiques infectées. L'interaction de DEN-C avec Daxx a pu être confirmée en cellules humaines et une co-localisation des deux protéines peut être observée dans le noyau de cellules infectées. La perte du NLS de DEN-C empêche sa translocation dans le noyau et son interaction avec Daxx [67]. De plus,

les cellules dans lesquelles l'interaction DEN-C-Daxx est compromise sont moins sensibles à l'apoptose médiée par Fas, suggérant que DEN-C induit l'apoptose des cellules infectées via Daxx [68]. Il a plus récemment été proposé que l'interaction de DEN-C avec Daxx empêcherait l'interaction entre Daxx et NF- κ B. Libérée, NF- κ B pourrait alors activer le promoteur de CD137, un membre de la famille du TNF et ainsi induire l'apoptose des cellules infectées [69].

Les rétrovirus constituent un autre exemple de l'implication de Daxx au cours d'une infection virale non pas liée à son activité de répresseur transcriptionnel mais à son rôle dans l'apoptose. Les virus de la famille des *Reoviridae* sont des virus non enveloppés à ARN double-brin. Dans un modèle d'encéphalite virale consistant en l'infection de tissu cérébral de souris avec des souches de rétrovirus neurotropes, un rôle important de Daxx dans l'apoptose des neurones

infectés a pu être mis en évidence [70]. Daxx cytoplasmique a été identifiée comme un médiateur de l'apoptose viro-induite *via* Fas. Ainsi, l'expression de mutants dominants négatifs de Daxx qui lient Fas mais sont incapables de relayer le signal de transduction inhibent l'apoptose induite par le réovirus. En revanche, l'expression de Daxx dans le noyau aurait quant à elle des conséquences anti-apoptotiques. Ces données suggèrent que la localisation sub-cellulaire de Daxx modulerait l'apoptose des neurones au cours d'une infection virale [70].

Sur la base d'interactions avec des protéines virales, l'implication de Daxx a été évoquée dans le cadre d'autres infections virales, mais des recherches plus approfondies sont nécessaires pour évaluer son rôle exact. C'est le cas du virus Puumala (PUUV), un hantavirus. Les hantavirus sont des virus enveloppés à ARN de polarité négative, appartenant à la famille des *Bunyaviridae*. Dans le cas du PUUV, c'est la protéine de capsid, N, qui a été identifiée comme un interactant de Daxx [71]. On peut également citer l'exemple du phage Φ C31, dont l'intégrase a été identifiée comme interagissant avec Daxx [72]. L'intégrase de ce virus procaryote est utilisée en thérapie génique, puisqu'elle permet l'insertion de gènes dans le génome au niveau de sites spécifiques. L'interaction de Daxx avec l'intégrase de Φ C31 conduit à une inhibition de l'enzyme virale, illustrée par une diminution du taux de recombinaison [72]. Aucun mécanisme moléculaire n'a cependant été proposé et d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette observation et déterminer le rôle de Daxx dans l'activité enzymatique de cette protéine virale.

Perspectives et conclusions

Les cellules de mammifères possèdent tout un arsenal de protéines dédiées à bloquer les infections virales. La plupart de ces protéines sont induites par l'interféron, ce qui permet de renforcer plus encore ces défenses. Les protéines MxA, PKR et 2-5A synthétase/RNase L ont été les premières et certainement les plus étudiées des protéines antivirales induites par l'interféron. La découverte de facteurs de restriction qui interfèrent spécifiquement avec la réplication du VIH-1, comme APOBEC3G, TRIM5 α , Tetherin/BST2, SAMHD1 ou MxB a provoqué une véritable effervescence de la recherche sur les mécanismes de l'immunité innée. Outre ces « protéines stars », de très nombreux autres facteurs de restriction ont depuis été découverts et se sont révélés capable d'inhiber un grand nombre de virus à différentes étapes de leur cycle répliatif. Cependant, force est de constater que ces défenses cellulaires, si elles limitent les infections virales, ne parviennent pas à les empêcher. Certains virus sont en effet parvenus à élaborer des

stratégies d'évitement ou de détournement de ces défenses, afin d'assurer leur propagation. L'exemple de Daxx illustre bien le fait que des virus non apparentés puissent être confrontés à la même activité de restriction et y échappent *via* différentes stratégies. De plus, certains virus, comme les herpèsvirus ou les rétrovirus ne parviennent pas seulement à échapper à la répression transcriptionnelle imposée par Daxx mais semblent pouvoir la détourner à leur avantage, notamment afin d'enclencher un état de latence. La protéine Daxx est une protéine complexe à étudier, en raison de la multitude de ses interactants mais aussi des multiples fonctions cellulaires dans lesquelles elle est impliquée et ce, dans plusieurs compartiments cellulaires. Si son rôle dans la réplication des virus à ADN est aujourd'hui plus clair, la compréhension de son impact sur la réplication des virus à ARN, et notamment les rétrovirus n'en est encore qu'à ses débuts.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- Escobar-Cabrera E, Lau DK, Giovinnazzi S, Ishov AM, McIntosh LP. Structural characterization of the DAXX N-terminal helical bundle domain and its complex with Rassf1C. *Structure* 2010; 18 : 1642-53.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89 : 1067-76.
- Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 2006; 16 : 97-104.
- Yeung PL, Chen LY, Tsai SC, Zhang A, Chen JD. Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin alpha3. *J Cell Biochem* 2008; 103 : 456-70.
- Lindsay CR, Morozov VM, Ishov AM. PML NBs (ND10) and Daxx: from nuclear structure to protein function. *Front Biosci* 2008; 13 : 7132-42.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 : 14075-80.
- Drane P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* 2010; 24 : 1253-65.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 2010; 140 : 678-91.
- Elsasser SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD, Patel DJ. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* 2012; 491 : 560-5.
- Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, *et al.* PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 1999; 147 : 221-34.
- Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* 1999; 18 : 6037-49.
- Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3 : 799-808.

13. Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 1006-16.
14. Maroui MA, El Asmi F, Dutrieux J, Chelbi-Alix MK, Nisole S. Implication of PML nuclear bodies in intrinsic and innate immunity. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 765-71.
15. Tavalai N, Stamminger T. New insights into the role of the sub-nuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1783 : 2207-21.
16. Geoffroy MC, Chelbi-Alix MK. Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *J Interferon Cytokine Res* 2011 ; 31 : 145-58.
17. Everett RD, Chelbi-Alix MK. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 2007 ; 89 : 819-30.
18. Schreiner S, Wodrich H. Virion factors that target Daxx to overcome intrinsic immunity. *J Virol* 2013 ; 87 : 10412-22.
19. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 2005 ; 18 : 1-12.
20. Li H, Leo C, Zhu J, et al. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 1784-96.
21. Ishov AM, Vladimirova OV, Maul GG. Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* 2004 ; 117 : 3807-20.
22. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 2006 ; 24 : 341-54.
23. Malim MH, Bieniasz PD. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *CSH Perspect Med* 2012 ; 2 : a006940.
24. Maul GG. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 1998 ; 20 : 660-7.
25. Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G, Sinclair JH. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 37652-60.
26. Ishov AM, Vladimirova OV, Maul GG. Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains. *J Virol* 2002 ; 76 : 7705-12.
27. Hofmann H, Sindre H, Stamminger T. Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol* 2002 ; 76 : 5769-83.
28. Saffert RT, Kalejta RF. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* 2006 ; 80 : 3863-71.
29. Lukashchuk V, McFarlane S, Everett RD, Preston CM. Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection. *J Virol* 2008 ; 82 : 12543-54.
30. Koriath F, Maul GG, Plachter B, Stamminger T, Frey J. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* 1996 ; 229 : 155-8.
31. Ahn JH, Hayward GS. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology* 2000 ; 274 : 39-55.
32. Reeves M, Woodhall D, Compton T, Sinclair J. Human cytomegalovirus IE72 protein interacts with the transcriptional repressor hDaxx to regulate LUNA gene expression during lytic infection. *J Virol* 2010 ; 84 : 7185-94.
33. Tsai K, Thikmyanova N, Wojcechowskyj JA, Delecluse HJ, Lieberman PM. EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-ATRX to activate viral early gene transcription. *PLoS Pathog* 2011 ; 7 : e1002376.
34. Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, et al. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 28113-21.
35. Full F, Jungnickl D, Reuter N, et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus tegument protein ORF75 is essential for viral lytic replication and plays a critical role in the antagonization of ND10-instituted intrinsic immunity. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003863.
36. Wysocka J, Herr W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* 2003 ; 28 : 294-304.
37. Maul GG, Guldner HH, Spivack JG. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 2679-90.
38. Glass M, Everett RD. Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J Virol* 2013 ; 87 : 2174-85.
39. Everett RD, Murray J, Orr A, Preston CM. Herpes simplex virus type 1 genomes are associated with ND10 nuclear substructures in quiescently infected human fibroblasts. *J Virol* 2007 ; 81 : 10991-1004.
40. Catez F, Picard C, Held K, et al. HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1002852.
41. Lukashchuk V, Everett RD. Regulation of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 infection by ND10 components ATRX and hDaxx. *J Virol* 2010 ; 84 : 4026-40.
42. Chelbi-Alix MK, de The H. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 1999 ; 18 : 935-41.
43. Salsman J, Zimmerman N, Chen T, Domagala M, Frappier L. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* 2008 ; 4 : e1000100.
44. Saffert RT, Penkert RR, Kalejta RF. Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34+ cells. *J Virol* 2010 ; 84 : 5594-604.
45. Wodrich H, Guan T, Cingolani G, Von Seggern D, Nemerow G, Gerace L. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J* 2003 ; 22 : 6245-55.
46. Schreiner S, Martinez R, Groitl P, et al. Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1002549.
47. Schreiner S, Wimmer P, Sirna H, et al. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J Virol* 2010 ; 84 : 7029-38.
48. Newhart A, Rafalska-Metcalf IU, Yang T, et al. Single cell analysis of RNA-mediated histone H3.3 recruitment to a cytomegalovirus promoter-regulated transcription site. *J Biol Chem* 2013 ; 288 : 19882-99.
49. Florin L, Schafer F, Sotlar K, Streeck RE, Sapp M. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology* 2002 ; 295 : 97-107.
50. Kivipold P, Vosa L, Ustav M, Kurg R. DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. *Viral J* 2015 ; 12 : 104.
51. Stepp WH, Meyers JM, McBride AA. Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *MBio* 2013 ; 4 : e00845-913.
52. Wolf D, Goff SP. Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* 2009 ; 458 : 1201-4.
53. Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 2007 ; 131 : 46-57.
54. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005 ; 16 : 1241-6.

55. Leung DC, Lorincz MC. Silencing of endogenous retroviruses: when and why do histone marks predominate? *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 127-33.
56. Hakre S, Chavez L, Shirakawa K, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; 6: 19-24.
57. Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 2002; 115: 3319-30.
58. Greger JG, Katz RA, Ishov AM, Maul GG, Skalka AM. The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J Virol* 2005; 79: 4610-8.
59. Shalginskikh N, Poleshko A, Skalka AM, Katz RA. Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx. *J Virol* 2013; 87: 2137-50.
60. Huang L, Xu GL, Zhang JQ, et al. Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 241-5.
61. Elsasser SJ, Noh KM, Diaz N, Allis CD, Banaszynski LA. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature* 2015; 522: 240-4.
62. Lucic M, Marini B, Ali H, Lucic B, Luzzati R, Giacca M. Proximity to PML nuclear bodies regulates HIV-1 latency in CD4+ T cells. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 665-77.
63. Dutrieux J, Maarifi G, Portilho DM, Arhel NJ, Chelbi-Alix MK, Nisole S. PML/TRIM19-dependent inhibition of retroviral reverse-transcription by Daxx. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1005280.
64. Zamborlini A, Coiffic A, Beauclair G, et al. Impairment of human immunodeficiency virus type-1 integrase SUMOylation correlates with an early replication defect. *J Biol Chem* 2011; 286: 21013-22.
65. Gurer C, Berthoux L, Luban J. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J Virol* 2005; 79: 910-7.
66. Turelli P, Doucas V, Craig E, et al. Cytoplasmic recruitment of IN1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell* 2001; 7: 1245-54.
67. Limjindaporn T, Netsawang J, Noisakran S, et al. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 334-9.
68. Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, et al. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res* 2010; 147: 275-83.
69. Netsawang J, Panaampon J, Khunchai S, et al. Dengue virus disrupts Daxx and NF-kappaB interaction to induce CD137-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 450: 1485-91.
70. Dionne KR, Zhuang Y, Leser JS, Tyler KL, Clarke P. Daxx upregulation within the cytoplasm of reovirus-infected cells is mediated by interferon and contributes to apoptosis. *J Virol* 2013; 87: 3447-60.
71. Li XD, Makela TP, Guo D, et al. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol* 2002; 83: 759-66.
72. Chen JZ, Ji CN, Xu GL, et al. DAXX interacts with phage PhiC31 integrase and inhibits recombination. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 6298-304.

Annexe 2 :

En plus de mon travail de thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à d'autres travaux menés dans l'équipe, qui ont fait l'objet d'une publication en 2019. Sachant que de nombreuses protéines de la famille TRIM sont capables de moduler la synthèse d'interféron, cette étude s'est focalisée sur l'implication de TRIM8 dans la régulation du facteur de transcription IRF7, responsable de la production d'interféron dans les pDC.

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

IMMUNOLOGY

TRIM8 is required for virus-induced IFN response in human plasmacytoid dendritic cells

Ghizlane Maarifi^{1*}, Nikaïa Smith^{2,3*}, Sarah Maillet¹, Olivier Moncorgé¹, Célia Chamontin¹, Joanne Edouard⁴, Frédéric Sohm⁴, Fabien P. Blanchet¹, Jean-Philippe Herbeuval², Georges Lutfalla⁵, Jean-Pierre Levraud⁶, Nathalie J. Arhel¹, Sébastien Nisole^{1†}

IMMUNOLOGY

TRIM8 is required for virus-induced IFN response in human plasmacytoid dendritic cells

Ghizlane Maarifi^{1*}, Nikaïa Smith^{2,3*}, Sarah Mailliet¹, Olivier Moncorgé¹, Célia Chamontin¹, Joanne Edouard⁴, Frédéric Sohm⁴, Fabien P. Blanchet¹, Jean-Philippe Herbeuval², Georges Lutfalla⁵, Jean-Pierre Levrard⁶, Nathalie J. Arhel¹, Sébastien Nisole^{1†}

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) play a crucial role in antiviral innate immunity through their unique capacity to produce large amounts of type I interferons (IFNs) upon viral detection. Tripartite motif (TRIM) proteins have recently come forth as important modulators of innate signaling, but their involvement in pDCs has not been investigated. Here, we performed a rationally streamlined small interfering RNA (siRNA)-based screen of TRIM proteins in human primary pDCs to identify those that are critical for the IFN response. Among candidate hits, TRIM8 emerged as an essential regulator of IFN regulatory factor 7 (IRF7) function. Mechanistically, TRIM8 protects phosphorylated IRF7 (pIRF7) from proteasomal degradation in an E3 ubiquitin ligase-independent manner by preventing its recognition by the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. Our findings uncover a previously unknown regulatory mechanism of type I IFN production in pDCs by which TRIM8 and Pin1 oppositely regulate the stability of pIRF7.

INTRODUCTION

Type I interferons (IFNs) are the main orchestrators of the antiviral innate immune response. Their expression is induced following the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by several classes of pattern recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLRs) and RIG-I-like receptors (1). Intracellular signaling pathways downstream of PRRs lead to the phosphorylation of IFN regulatory factor 7 (IRF7) and IRF3, thus promoting their dimerization and translocation to the nucleus where they activate the transcription of type I IFN genes.

IRF3 and IRF7 share some structural and functional similarities, but they hold widely distinct roles in the systemic response to infection. While the expression of IRF7 requires the previous activation of IRF3 in most cell types, it is ubiquitously and constitutively expressed in plasmacytoid dendritic cells (pDCs), a rare DC subtype that plays a pivotal role in immunity (2, 3). Constitutive IRF7 expression allows pDCs to rapidly produce large amounts of type I IFN in response to viruses, making them a professional type I IFN-producing cell type that accounts for most circulating type I IFN during an antiviral innate immune response (2, 3).

pDCs are activated following the sensing of viral RNA or DNA by TLR7 and TLR9, respectively. PAMP detection causes the adaptor protein MyD88 to engage a multiprotein signaling complex composed of IRAK1, IRAK4, TRAF6, and IKK α . The recruitment of IRF7 to this complex triggers its phosphorylation, dimerization, and translocation to the nucleus (4). These signaling pathways are tightly regulated at multiple levels both by potent activators that implement a rapid and robust IFN response following infection and by equally potent inhibitors that prevent an exacerbated or prolonged activation that may lead to adverse pathogenic effects (5, 6).

¹IRIM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France. ²CBMIT, CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France. ³Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany. ⁴AMAGEN, CNRS, INRA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ⁵DIMNP, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁶Unité Macro-phages et Développement de l'Immunité, CNRS, Institut Pasteur, Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: sebastien.nisole@irim.cnrs.fr

Copyright © 2019
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
NonCommercial
License 4.0 (CC BY-NC).

Proteins of the tripartite motif (TRIM) family have recently emerged as potentially important regulators of innate immune pathways. TRIM proteins are a large family of E3 ubiquitin ligases that share an N-terminal TRIM composed of a RING domain, one or two B boxes, and a coiled coil domain (7, 8). Among the 75 human TRIM proteins, some have been described as critical immunoregulatory proteins, acting at multiple steps of signaling pathways (9–12). However, although the implication of a few TRIM proteins has been extensively studied and validated in appropriate primary cells and/or in mouse models, the comparative profiling of all TRIM proteins in the relevant type I IFN-producing cells in vivo has not been performed. We report here the results of the first small interfering RNA (siRNA) screen performed in human primary pDCs, which allowed us to identify TRIM8 as an essential positive regulator of the virus-induced IFN response.

RESULTS

TRIM8, TRIM20, TRIM21, TRIM22, TRIM28, TRIM36, TRIM38, TRIM46, and TRIM49 identified as potential regulators of IFN response in human pDCs

Because human primary pDCs account for less than 0.5% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), a comprehensive siRNA screen of the entire TRIM protein family cannot be achieved on single blood donors. Therefore, to perform a rationally streamlined screen of TRIM proteins that could conceivably be implicated in TLR downstream signaling cascade in pDC, we first determined which TRIM family members are constitutively expressed in human pDCs. We purified primary human pDCs from the blood of three healthy donors (fig. S1A) and performed a systematic transcriptional profiling of all *TRIM* genes by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (Table 1). Our results indicated that, among the 75 known *TRIM* genes, only 18 are expressed at detectable levels under steady-state conditions (Fig. 1A). Among them, TRIM8, TRIM22, and TRIM28 had the highest constitutive expression in resting pDCs.

Next, we investigated which *TRIM* genes are induced in pDCs following activation by RNA viruses and could thus be involved in a feedback loop to control the signaling pathway leading to IFN production. Primary pDCs were stimulated with HIV-1 or influenza A virus

Table 1. List of the 114 transcripts simultaneously quantified by RT-qPCR profiling, including 6 housekeeping genes (1 to 6), 75 TRIM genes (7 to 81), 17 ISGs (82 to 98), 9 IFNs (99 to 107), and 7 inflammatory cytokines or chemokines (108 to 114). For each transcript, the official name, the alias name, if any, and the RefSeq accession number are indicated.

Transcript	Alias	Ref Seq	Transcript	Alias	Ref Seq	Transcript	Alias	Ref Seq
1	SDHA	NM_004168	39	TRIM35	NM_171982	77	TRIM74	NM_198853
2	TBP	NM_003194	40	TRIM36	NM_018700	78	TRIM75P	TRIM75 NG_016722
3	POLR2A	NM_000937	41	TRIM37	NM_015294	79	CMYA5	TRIM76 NM_153610
4	PPIA	CypA NM_021130	42	TRIM38	NM_006355	80	TRIM77	NM_001146162
5	PPIB	CypB NM_000942	43	TRIM39	NM_021253	81	TRIML1	NM_178556
6	B2M	NM_004048	44	TRIM40	NM_138700	82	IFIT1	NM_001548
7	MID2	TRIM1 NM_012216	45	TRIM41	NM_201627	83	IFIT2	NM_001547
8	TRIM2	NM_015271	46	TRIM42	NM_152616	84	IFIT3	NM_001549
9	TRIM3	NM_006458	47	TRIM43	NM_138800	85	IFITM1	NM_003641
10	TRIM4	NM_033017	48	TRIM44	NM_017583	86	IFITM2	NM_006438
11	TRIM5	NM_033093	49	TRIM45	NM_025188	87	IFITM3	NM_021034
12	TRIM6	NM_058166	50	TRIM46	NM_025058	88	ISG15	NM_005101
13	TRIM7	NM_033342	51	TRIM47	NM_033452	89	ISG20	NM_002201
14	TRIM8	GERP NM_030912	52	TRIM48	NM_024114	90	EIF2AK2	PKR NM_002759
15	TRIM9	NM_015163	53	TRIM49	NM_020388	91	Mx1	NM_001144925
16	TRIM10	NM_006778	54	TRIM50	NM_178125	92	Mx2	NM_002463
17	TRIM11	NM_145214	55	SPRYD5	TRIM51 NM_032681	93	TNFSF10	TRAIL NM_001190942
18	TRIM13	NM_005798	56	TRIM52	NM_032765	94	APOBEC3A	NM_145699
19	TRIM14	NM_014788	57	TRIM53AP	TRIM53 NR_028346.1	95	APBEC3G	NM_021822
20	TRIM15	NM_033229	58	TRIM54	NM_187841	96	BST2	Tetherin NM_004338
21	TRIM16	NM_006470	59	TRIM55	NM_184087	97	RSAD2	Viperin NM_080657
22	TRIM17	NM_016102	60	TRIM56	NM_030961	98	DDX58	RIG-I NM_014314
23	MID1	TRIM18 NM_000381	61	TRIM58	NM_015431	99	IFNA1	NM_024013
24	PML	TRIM19 NM_033238	62	TRIM59	NM_173084	100	IFNA2	NM_000605
25	MEFV	TRIM20 NM_000243	63	TRIM60	NM_152620	101	IFNA4	NM_021068
26	TRIM21	Ro52 NM_003141	64	TRIM61	NM_001012414	102	IFNA5	NM_002169
27	TRIM22	Staf50 NM_006074	65	TRIM62	NM_018207	103	IFNA8	NM_002170
28	TRIM23	NM_001656	66	TRIM63	NM_032588	104	IFNB1	NM_002176
29	TRIM24	NM_003852	67	TRIM64	XM_061890	105	IFNL1	IL29 NM_172140
30	TRIM25	NM_005082	68	TRIM65	NM_173847	106	IFNL2	IL28A NM_172138
31	TRIM26	NM_003449	69	TRIM66	NM_014818	107	IFNG	NM_000619
32	TRIM27	NM_006510	70	TRIM67	NM_001004342	108	IL1B	NM_000576
33	TRIM28	NM_005762	71	TRIM68	NM_018073	109	IL4	NM_000589
34	TRIM29	NM_012101	72	TRIM69	NM_182985	110	IL6	NM_000600
35	TRIM31	NM_007028	73	TRIM16L	TRIM70 NM_001037330	111	IL10	NM_000572
36	TRIM32	NM_012210	74	TRIM71	NM_001039111	112	TNF	NM_000594
37	TRIM33	NM_015906	75	TRIM72	NM_001008274	113	CXCL8	IL8 NM_000584
38	TRIM34	NM_021616	76	TRIM73	NM_198924	114	CXCL10	IP-10 NM_001565

(IAV), which potently activate pDCs through TLR7 within endosomes (13, 14). The triggering of the TLR7/IRF7 signaling pathway was monitored by measuring both intracellular (Fig. 1B) and secreted (Fig. 1, C and D) type I IFNs, which indicated that both viruses achieved comparable levels of activation at the doses of inoculum used. As previously reported, activated pDCs produce large amounts of type I IFNs but no IFN- γ (Fig. 1C) (3). We then performed the transcriptional profiling of all 75 TRIM genes in HIV- or IAV-activated pDCs purified from the blood of three individual donors. We quantified simultaneously the expression of 114 genes, including 6 housekeeping genes, 17 IFN-induced genes (ISGs), 16 virus-induced cytokines and chemokines, and the 75 human TRIM genes (Table 1). As shown in Fig. 1E, while most tested cytokines, chemokines, and ISGs were highly induced by both viruses, less than half of TRIM transcripts were up-regulated by either HIV-1 or IAV, and only a handful were induced by both. Among

them, TRIM20, TRIM36, TRIM46, and TRIM49 had the strongest activation profiles, ranging from 6-fold (TRIM49) to 107-fold (TRIM20) increase upon HIV-1 infection and from 9-fold (TRIM46) to 44-fold (TRIM20) increase following IAV detection (Fig. 1E and fig. S1B).

These profiling experiments allowed us to streamline our analysis to seven key TRIM proteins that were either expressed at high constitutive levels (TRIM8, TRIM22, and TRIM28) or induced following viral activation (TRIM20, TRIM36, TRIM46, and TRIM49) in human pDCs. These TRIM proteins identified as the most relevant to pDC biology could constitute potential regulators of IFN production in virus-activated pDCs. On the basis of the abundant literature on TRIM proteins, we added two other candidates to our short list, TRIM21 and TRIM38, which were moderately up-regulated by both viruses, by four- and twofold, respectively (Fig. 1E). Although their function was not investigated in pDCs, their mode of action suggests that they

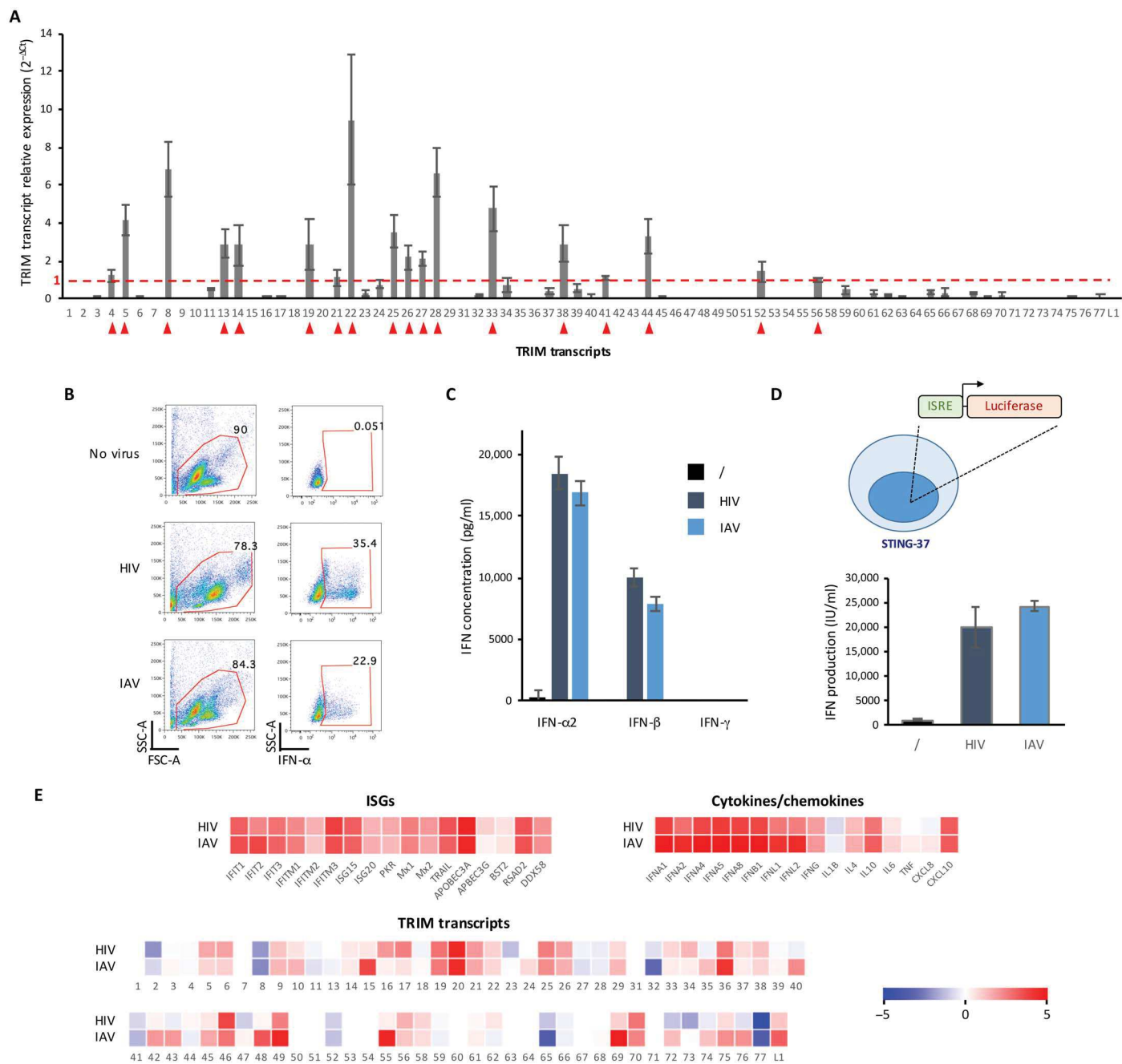


Fig. 1. Constitutively expressed and virus-induced TRIM genes in human primary pDCs. (A) Systematic analysis of constitutive expression of all human TRIM genes in pDCs by RT-qPCR analysis. Data represent the mean \pm SD of independent experiments performed in duplicate on purified pDCs from three different blood donors. Red arrows point to TRIM genes that are constitutively expressed at detectable levels above the geometric mean of the six different housekeeping genes ($2^{-\Delta Ct} > 1$). (B) Purified pDCs were stimulated overnight with HIV-1 MN AT-2 or influenza A virus (IAV). Cytokine secretion was blocked for 12 hours using BFA at $1 \mu\text{g/ml}$. Intracellular IFN- α was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) after fixation and saponin permeabilization. (C and D) IFN secreted in the culture medium by virus-activated pDCs was titrated using two different techniques: The concentration of IFN- $\alpha 2$, IFN- β , and IFN- γ was quantified by the multiplex bead-based immunoassay LEGENDplex (BioLegend) (C), or global (type I and type II) IFN activity was quantified using the STING-37 reporter cell line, which expresses luciferase under the control of five IFN-stimulated response elements (ISRE) (D). (E) Purified pDCs from three donors were activated with HIV-1 MN AT-2 or IAV for 16 hours, and the transcriptional profiles of 114 genes [6 housekeeping genes, 17 IFN-induced genes (ISGs), 16 virus-induced cytokines and chemokines, and the 75 human TRIM genes] were analyzed simultaneously by RT-qPCR. The expression of each transcript was normalized to the geometric mean of a set of stably expressed reference genes (*SDHA*, *PPIB*, *TBP*, *POLR2A*, *PPIA*, and *B2M*). Data represent the mean of three independent experiments performed in duplicate on purified pDCs from different blood donors. Values were converted to \log_2 and represented as heat maps. Raw data are shown in fig. S1B.

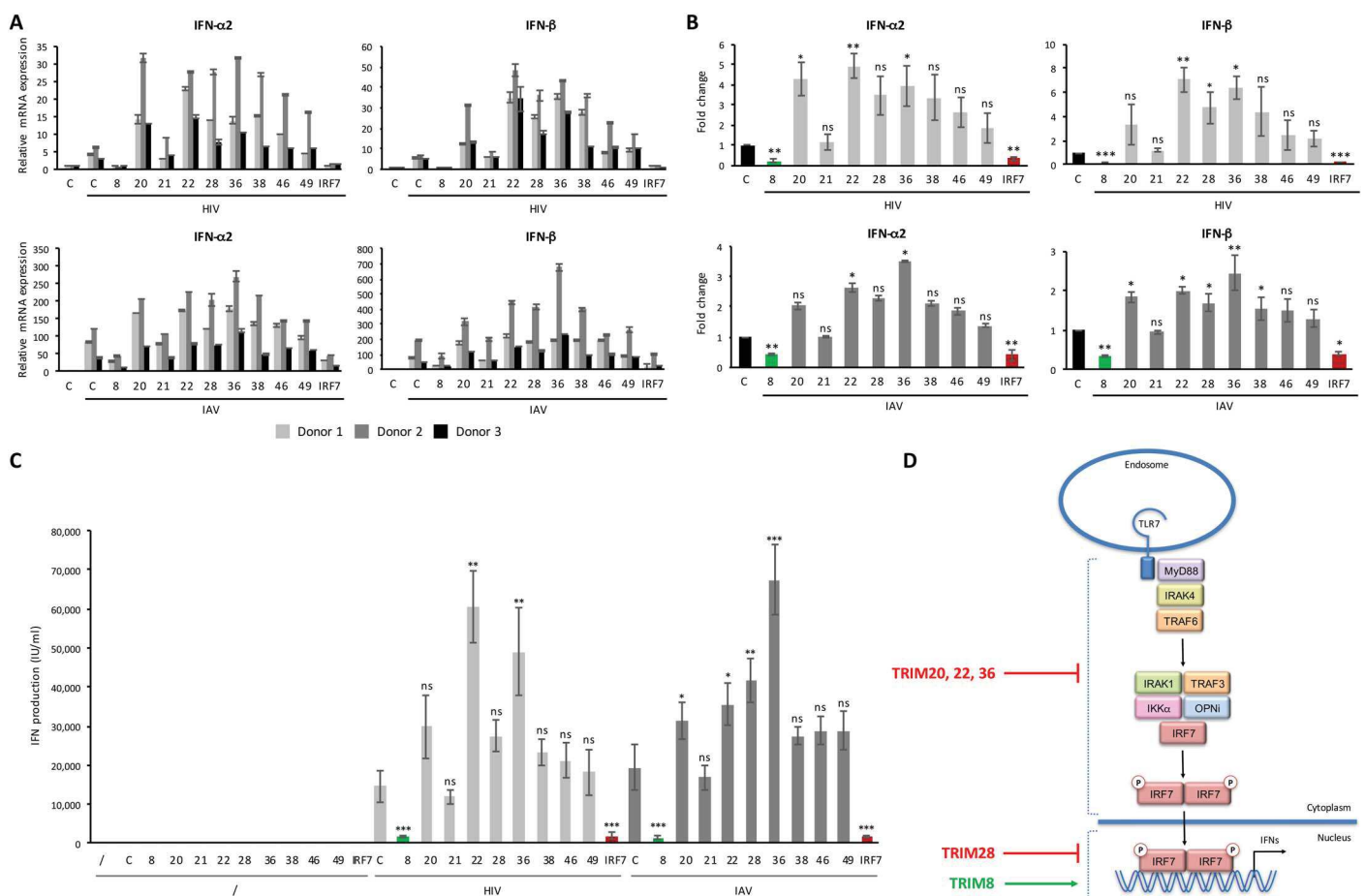


Fig. 2. Effect of TRIM gene silencing on virus-induced IFN response in human primary pDCs. (A to C) Purified pDCs from three donors were transfected with nontargeting siRNA (C) or with siRNA targeting selected TRIM transcripts (TRIM8, TRIM20, TRIM21, TRIM22, TRIM28, TRIM36, TRIM38, TRIM46, or TRIM49) or IRF7 as a control. After 24 hours, pDCs were activated with HIV-1 MN AT-2 or IAV for 16 hours before the expression of type I IFN was determined both at the transcript level by RT-qPCR (A and B) and as mean fold change of all donors relative to control siRNA (B). (C) For the quantification of IFN in the culture medium, STING-37 cells were incubated for 24 hours with the supernatant of activated pDCs or with known concentrations of recombinant IFN- α 2. Statistical significance (P value) was calculated by one-way analysis of variance (ANOVA). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant. (D) Schematic model of TRIM proteins identified as positive (in green) and negative (in red) regulators of TLR7-dependent IFN response in human pDCs. The putative compartment (cytoplasm or nucleus) where TRIM proteins act is based on their known subcellular localization (8).

could be relevant negative regulators of IFN response. In particular, TRIM21 was described as a negative regulator of IRF7 (15), whereas TRIM38 was found to promote TRAF6 degradation (16).

TRIM8, TRIM20, TRIM22, TRIM28, and TRIM36 are regulators of IFN response in virus-activated human pDCs

To determine the role of the selected TRIM proteins on innate signaling pathways downstream of TLR7, we performed an siRNA-based screen using a robust method that we published previously (17). Purified pDCs from three blood donors were transfected with each TRIM-specific siRNA pool and treated with HIV-1 or IAV to trigger an IFN response. An siRNA directed against IRF7 was used as control, because IRF7 silencing abolishes IFN production in pDCs (17). All targeted transcripts were knocked down, with mean efficiencies ranging between 60 and 75% (fig. S1C).

We first evaluated the effect of TRIM knockdown on type I IFN transcription by RT-qPCR. While TRIM21, TRIM46, and TRIM49 knockdowns did not affect the transcription of type I IFN genes, silenc-

ing of TRIM20, TRIM22, TRIM28, and TRIM36 led to a significant increase in IFN response in response to both HIV-1 and IAV (Fig. 2, A and B). TRIM8 knockdown virtually abolished IFN- α and IFN- β transcription to the same extent as IRF7 silencing (Fig. 2, A and B). These results were confirmed at the protein level by titrating IFNs in the culture supernatant of virus-activated pDCs (Fig. 2C). Together, our siRNA screen led to the identification of TRIM20, TRIM22, TRIM28, and TRIM36 as negative regulators of IFN response in human pDCs, whereas TRIM8 was the only positive regulator identified. These results are summarized in Fig. 2D.

TRIM8 is a nuclear protein that is required for pIRF7-induced IFN production in pDCs

The fact that TRIM8 knockdown almost completely abolished IFN production was notable and suggested that TRIM8 could act as an essential positive regulator of the antiviral response. To gain understanding of the components of the signaling cascade that TRIM8 might engage with, we first examined its subcellular localization in

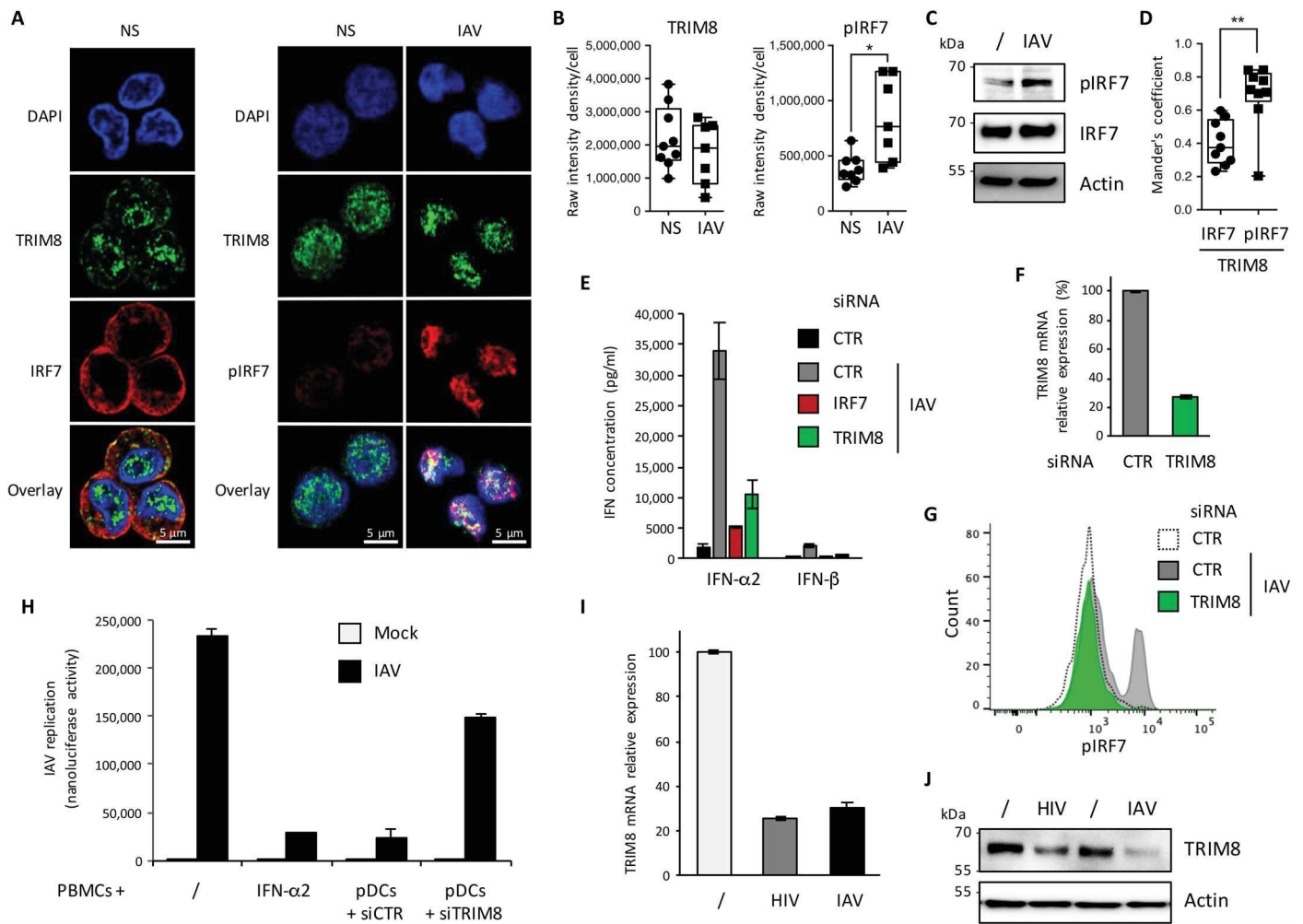


Fig. 3. TRIM8 knockdown inhibits IFN secretion through a decrease of pIRF7 in human primary pDCs. (A) Subcellular localization of TRIM8 and IRF7 or pIRF7 was visualized by immunofluorescent confocal microscopy on naive pDCs (NS) or pDCs stimulated for 6 hours with IAV. (B) Raw intensity density per cell of TRIM8 and pIRF7 staining was measured using ImageJ software. Data represented by box and whiskers with median \pm min to max represent the analysis of 30 cells from nine different fields. * $P < 0.05$, by Mann-Whitney test. (C) Expression of pIRF7 and IRF7 in IAV-stimulated pDCs was assessed by Western blot. (D) Mander's coefficients were determined using the ImageJ JACoP plug-in to evaluate the colocalization between IRF7 and TRIM8 or between pIRF7 and TRIM8 in unstimulated or IAV-stimulated cells, respectively. The analysis was performed on 30 cells from nine different fields. ** $P < 0.01$, by Mann-Whitney test. (E to G) Human pDCs were transfected with nontargeting siRNA (CTR) or with a TRIM8-specific siRNA and activated 24 hours later with IAV for 16 hours. (E) The concentration of IFN- α 2 and IFN- β secreted in the culture medium by IAV-activated pDCs was quantified with the multiplex bead-based immunoassay LEGENDplex (BioLegend). (F) TRIM8 expression was verified by RT-qPCR. To quantify the amount of pIRF7 by flow cytometry, cells were fixed, permeabilized, and labeled with mouse Alexa Fluor 488 anti-IRF7 (pS477/pS479) antibody. (G) Representative flow cytometry histogram of pIRF7 expression in nonactivated control (dotted line), IAV-stimulated control (gray), or TRIM8 knockdown pDCs (green). (H) pDCs were transfected with nontargeting siRNA (siCTR) or with a TRIM8-specific (siTRIM8) siRNA and activated for 16 hours with R848 (5 μ g/ml). Activated pDCs were then cocultured with autologous PBMCs at a ratio of 1:10. After 24 hours of coculture, PBMCs were mock-infected (/) or infected with 2.5×10^4 PFU/well of the IAV nanoluciferase-expressing reporter virus for 24 hours before nanoluciferase activity was measured on an Infinite F200 Pro (Tecan) plate reader. As controls, PBMCs were cultivated without pDCs and were either left untreated (/) or treated with 1000 IU of IFN- α 2 before challenged with the same dose of IAV reporter virus. Data represent the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate, representative of two independent experiments performed on cells from two blood donors. (I and J) Human pDCs were activated with HIV-1 MN or IAV, and TRIM8 expression was determined by RT-qPCR (I) and Western blot (J) 6 or 24 hours after stimulation, respectively.

primary human pDCs. We observed that TRIM8 is predominantly expressed in the nucleus in both resting and IAV-stimulated pDCs, suggesting that viral activation does not induce its relocalization (Fig. 3, A and B). Because the signaling cascade leading to the activation of IRF7 takes place exclusively in the cytoplasm, the nuclear localization of TRIM8 suggested that it might be involved in nuclear steps following the nuclear translocation of phosphorylated IRF7 (pIRF7) dimers and before the nuclear export of type I IFN transcripts (18). Stimulation of pDCs with IAV led to IRF7 phosphorylation

(Fig. 3C) and translocation into the nucleus (Fig. 3A), where it was found to colocalize with TRIM8 with a Mander's coefficient of 0.7 ± 0.2 (Fig. 3D). Furthermore, while the amount of IFN- α and IFN- β secreted by IAV-activated pDCs was markedly inhibited (Fig. 3, E and F), TRIM8 knockdown also led to a profound decrease of the amount of pIRF7 (Fig. 3G), further suggesting that TRIM8 might stabilize pIRF7 in the nucleus. In the organism, pDCs can protect surrounding cells from viral infections through the secretion of type I IFNs. Because TRIM8 knockdown causes a marked decrease of IFN

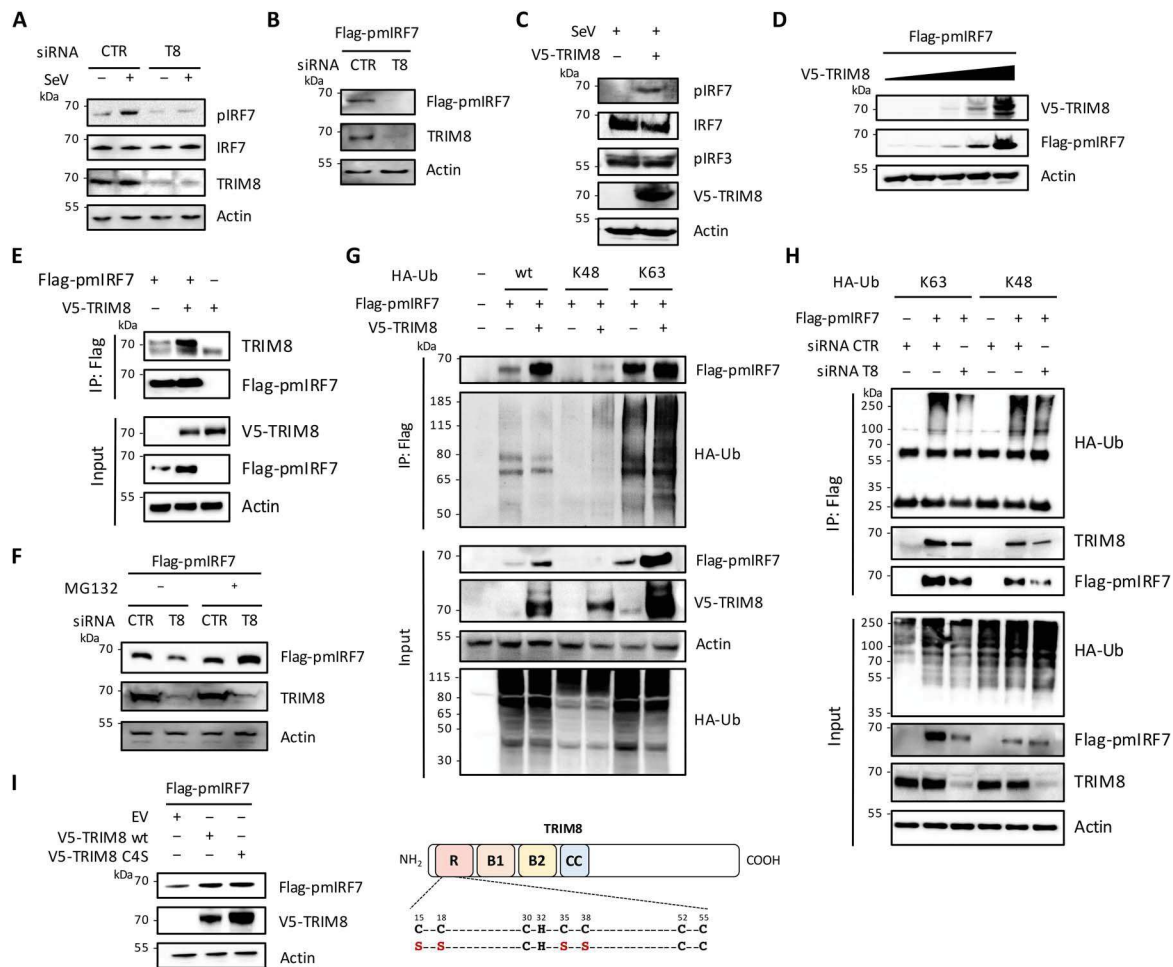


Fig. 4. TRIM8 regulates pIRF7 stability independently of its E3 ubiquitin ligase activity. (A) HEK293T cells were transfected with nontargeting control (CTR) or TRIM8-specific (T8) siRNA. Twenty-four hours after transfection, expression of endogenous IRF7 was induced by treating the cells with 1000 IU of IFN- α 2 for 16 hours and cells were infected with SeV to trigger IRF7 phosphorylation. Equal amounts of cell extracts were analyzed by Western blot for the expression of TRIM8, IRF7, and pIRF7. (B) HEK293T cells expressing Flag-tagged phosphomimetic IRF7 (S477D/S479D) construct (Flag-pmIRF7) were transfected with nontargeting control (CTR) or TRIM8-specific siRNA. After 48 hours, whole-cell lysates were analyzed by Western blot with anti-Flag or anti-TRIM8 antibodies (Abs). (C) HEK293T cells were treated with 1000 IU of IFN- α 2 for 16 hours and transfected or not with a plasmid expressing V5-TRIM8. The expression of endogenous IRF7, pIRF7, and pIRF3 following SeV infection was evaluated by Western blot. (D) Whole-cell lysates obtained from HEK293T cells expressing Flag-pmIRF7 and transfected with increasing amounts of V5-TRIM8 for 48 hours were subjected to Western blot analysis using anti-Flag or anti-V5 antibodies. (E) Flag-pmIRF7-expressing HEK293T cells were transfected with V5-TRIM8. After IP using anti-Flag antibodies, TRIM8 was detected using anti-V5 antibodies. (F) HEK293T cells expressing Flag-pmIRF7 were transfected with either a nontargeting siRNA (CTR) or an siRNA targeting TRIM8 for 48 hours. Six hours before cell extraction, cells were treated with MG132 to block proteasomal degradation. Expression of Flag-pmIRF7 and TRIM8 was assessed by Western blot using anti-Flag and anti-TRIM8 antibodies, respectively. (G) Lysates from HEK293T cells co-transfected with Flag-pmIRF7, V5-TRIM8, and empty vector (EV), HA-Ub (wt), HA-Ub (K48), or HA-Ub (K63) plasmids were subjected to IP with anti-Flag antibody followed by Western blot analysis with anti-Flag, anti-V5, or anti-HA antibodies. (H) HEK293T were cotransfected with Flag-pmIRF7 and HA-Ub (K63) or HA-Ub (K48) plasmids and with nontargeting control (CTR) or TRIM8-specific siRNA. After 48 hours, whole-cell lysates were subjected to IP with anti-Flag antibody followed by Western blot analysis with anti-Flag, anti-TRIM8, and anti-HA antibodies. (I) Flag-pmIRF7-expressing HEK293T cells were transfected with V5-TRIM8 wt, V5-TRIM8 mutant C15S/C18S/C35S/C38S (V5-TRIM8 C4S), or empty vector. After 48 hours, cell extracts were subjected to Western blot analysis using anti-Flag or anti-V5 antibodies. All panels show typical results representative of at least two independent experiments.

production by activated pDCs, it is also likely to inhibit their antiviral functions. To formally demonstrate this, we showed that pDCs transfected with a nontargeting siRNA and activated with the TLR7 agonist R848 can protect autologous PBMCs from IAV infection, whereas TRIM8-silenced pDCs cannot (Fig. 3H).

While TRIM8 appears essential for IFN response in pDCs, we also found that its expression was down-regulated following viral activation (Fig. 1E). We further confirmed this observation by showing that TRIM8 expression is diminished upon activation of pDCs with

either HIV or IAV both at the mRNA (6 hours after stimulation; Fig. 3I) and at the protein level (24 hours after stimulation; Fig. 3J), thus suggesting that TRIM8 expression is regulated by a negative feedback loop.

TRIM8 stabilizes pIRF7 through an E3 ubiquitin ligase-independent mechanism

To obtain mechanistic insight into the regulatory role of TRIM8, we took advantage of a simpler and more versatile cell model, human

embryonic kidney (HEK) 293T cells, in which TRIM8 was also identified as an enhancer of innate immune signaling (11). Although IRF7 is not constitutively expressed in HEK293T cells, its expression can be induced to pDC levels by pretreatment with IFN- α (19) or by transfection of an expression plasmid. Because HIV-1 and IAV either do not trigger a sufficiently robust IFN response or induce cytotoxicity in this cell type, activation of innate immune pathways was achieved by infection with a defective-interfering Sendai virus (SeV) (Fig. 4A) (20). In this model, TRIM8 silencing strongly reduced the amount of pIRF7 following SeV infection (Fig. 4A), confirming the phenotype observed in pDCs upon HIV-1 and IAV treatment. Furthermore, because SeV specifically activates RIG-I (20), these results indicate that the effect of TRIM8 on pIRF7 is independent of the upstream pathway that leads to its activation. Next, we evaluated the effect of TRIM8 expression on a phosphomimetic IRF7 mutant (Flag-pIRF7 S477D/S479D), which is constitutively active and can thus stimulate IFN expression in the absence of viral infection (21). TRIM8 silencing also led to a lower expression of phosphomimetic IRF7 (Fig. 4B), confirming that TRIM8 is likely to act directly on the activated form of IRF7 that translocates to the nucleus upon PAMP detection. Conversely and as expected, TRIM8 overexpression increased the proportion of phosphorylated form of endogenous IRF7 upon SeV infection (Fig. 4C) as well as the amount of phosphomimetic IRF7 (Fig. 4D). In

contrast, TRIM8 overexpression did not increase the amount of pIRF3, thus pointing out the specificity of TRIM8 for pIRF7 (Fig. 4C).

Having confirmed that TRIM8 increases the amount of pIRF7 in both pDCs and HEK293T cells, we addressed how this is achieved. First, we showed that TRIM8 and pIRF7 can be efficiently coimmunoprecipitated (Fig. 4E), indicating that the nuclear colocalization of TRIM8 and pIRF7 (Fig. 3B) corresponds to a physical interaction between the two proteins. Next, we demonstrated that the decrease in pIRF7 expression following TRIM8 knockdown could be reversed by a proteasome inhibitor, indicating that TRIM8 stabilizes pIRF7 by preventing its degradation (Fig. 4F).

Because most regulators of innate immune signaling pathways of the TRIM protein family act through the E3 ubiquitin ligase activity of their RING domain (10), we addressed whether the stability of pIRF7 might be regulated by ubiquitination. We therefore tested the propensity of pIRF7 to be ubiquitinated by K48-linked polyubiquitination, which typically targets proteins for proteasomal degradation, or by K63-linked polyubiquitination, which tends to promote stability and activity (22, 23). HEK293T cells overexpressing exogenous pIRF7 were transfected with ubiquitin mutants K48 and K63, which contain arginine substitutions of all lysine residues except at positions 48 and 63, respectively (Fig. 4G). The appearance of ubiquitin chains was assessed specifically on immunoprecipitated pIRF7.

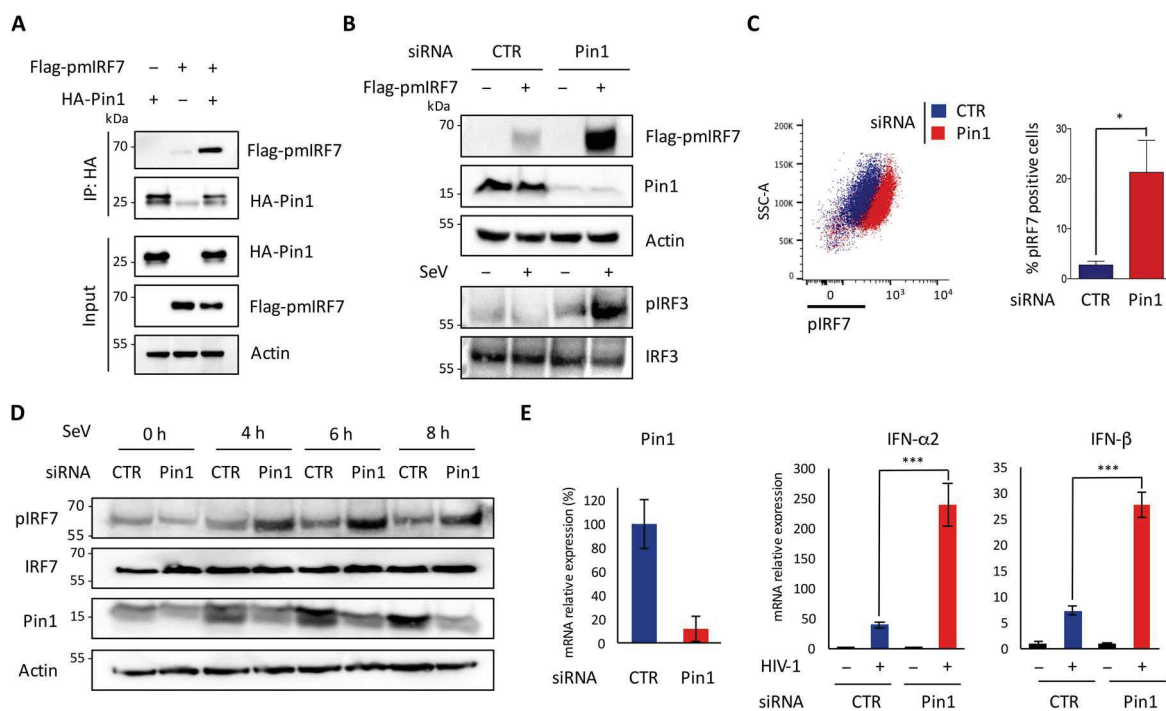


Fig. 5. pIRF7 is a Pin1 substrate. (A) HEK293T cells were transfected with HA-Pin1 together with or without Flag-tagged phosphomimetic IRF7 (Flag-pmIRF7). Following IP with anti-HA antibodies, pmIRF7 was revealed using an anti-Flag antibody. (B) HEK293T cells were transfected with Flag-pmIRF7 and with nontargeting (CTR) or Pin1-specific siRNA, as indicated. Pin1 and pIRF7 expression was assessed by Western blot using anti-Pin1 or anti-Flag antibodies, respectively. To follow the phosphorylation of endogenous IRF3 as an internal control, cells were also infected with SeV for 6 hours before preparing the extracts, and the expression of IRF3 and pIRF3 was assessed by Western blot. (B) and (C) show typical results representative of at least two independent experiments. (C) Pin1 expression was silenced in HEK293T cells using siRNA, while endogenous IRF7 expression was induced by 1000 IU of IFN- α 2. Cells were then infected with SeV for 6 hours, and the amount of pIRF7 was evaluated by flow cytometry. Graph shows the mean of three independent experiments \pm SD. Statistical significance (P value) was determined by Student's t test. * P < 0.05. (D) HEK293T cells were transfected with a nontargeting (CTR) or a Pin1-targeting siRNA. IRF7 expression was induced by a 16-hour treatment with 1000 IU of IFN- α 2, and activation of IRF7 was triggered by SeV infection. The expression levels of pIRF7, IRF7, and Pin1 were assessed by Western blot at different time points after infection, as indicated. (E) Human pDCs from two different donors were transfected with nontargeting siRNA (CTR) or with a Pin1-specific siRNA. Twenty-four hours after transfection, cells were stimulated with HIV-1 for 16 hours, and IFN- α 2 and IFN- β mRNA was quantified by RT-qPCR. The results shown are mean \pm SD. Statistical significance (P value) was determined by Student's t test. *** P < 0.001. Data are representative of three independent experiments.

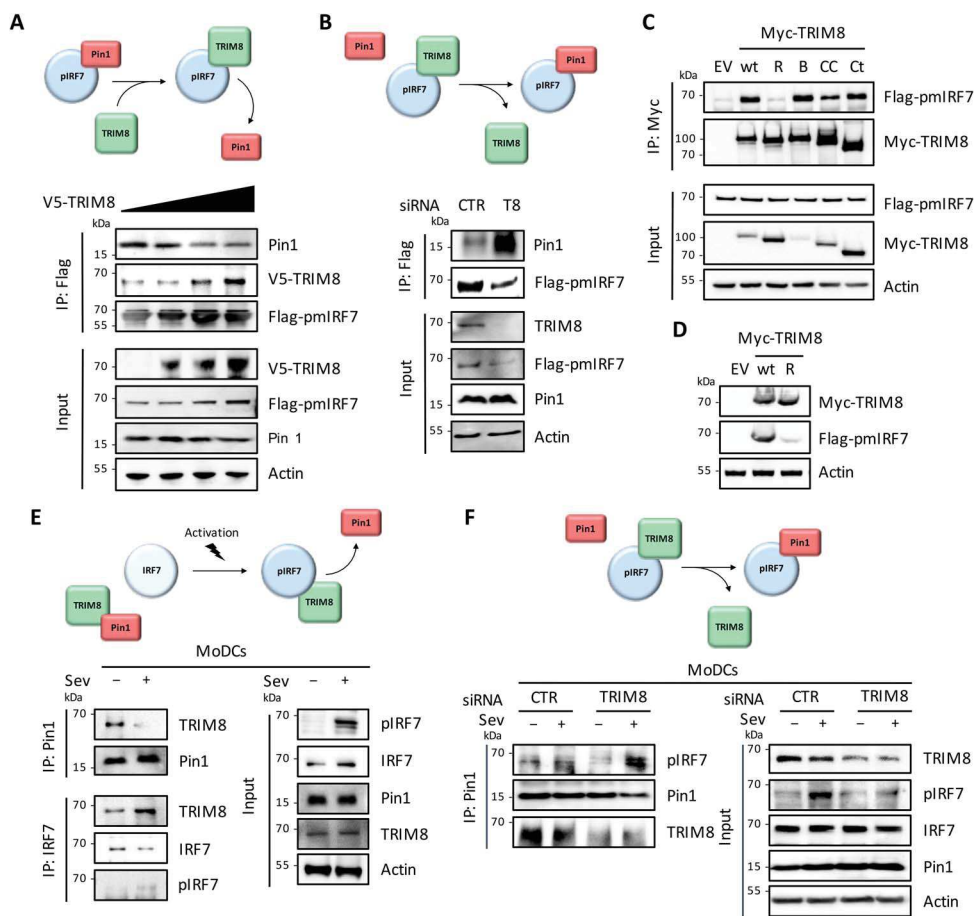


Fig. 6. TRIM8 interferes with the recognition of pIRF7 by Pin1. (A) HEK293T cells expressing Flag-tagged phosphomimetic IRF7 (Flag-pmIRF7) were transfected with increasing quantity of the V5-TRIM8 plasmid. Following IP with anti-Flag antibodies, the presence of Pin1, V5-TRIM8, and Flag-pmIRF7 was assessed by Western blot. (B) Flag-pmIRF7-expressing HEK293T cells were transfected with a nontargeting (CTR) or a TRIM8-specific siRNA. Flag-pmIRF7 was pulled down using anti-Flag antibodies, and Pin1 was detected by Western blot. (C) Flag-pmIRF7-expressing HEK293T cells were transfected with empty vector, Myc-tagged full-length TRIM8 (wt), or TRIM8 deleted from one domain [RING (R), B box (B), coiled coil (CC), or C-terminal domain (Ct)] in the presence of MG132 to prevent pmIRF7 degradation. Following pull-down with anti-Myc antibodies, the presence of pmIRF7 was revealed by Western blot using anti-Flag antibodies. (D) HEK293T cells expressing Flag-pmIRF7 were transfected with wt or Δ RING (R) Myc-tagged TRIM8. TRIM8 and pmIRF7 expression was assessed by Western blot using anti-Myc or anti-Flag antibodies, respectively. (E) Primary human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) were treated for 16 hours with 1000 IU of IFN- α 2 to induce endogenous IRF7 expression and infected or not with SeV for 3 hours to induce its phosphorylation. Following IP with anti-Pin1 or anti-IRF7 antibodies, the presence of pIRF7, IRF7, Pin1, and TRIM8 was assessed by Western blot, as indicated. (F) Primary MoDCs were transfected with a nontargeting (CTR) or a TRIM8-specific siRNA, treated for 16 hours with 1000 IU of IFN- α 2, and infected or not with SeV for 3 hours. Forty-eight hours after transfection, expression levels of TRIM8, pIRF7, IRF7, and Pin1 were assessed by Western blot. Following IP with anti-Pin1 antibodies, the presence of Pin1, pIRF7, and TRIM8 was assessed by Western blot.

Results suggested that pIRF7 can undergo both K48 and K63 polyubiquitination, leading to its degradation and stabilization, respectively. Overexpressing TRIM8 led to a markedly increased amount of pIRF7 in all conditions (Fig. 4G, Input), as anticipated, and as a consequence, the amount of K48- and K63-linked ubiquitin upon pIRF7 immunoprecipitation (IP) was higher (Fig. 4G, IP: Flag). This suggested that TRIM8 stabilizes pIRF7 independently of its ubiquitination status. Likewise, TRIM8 knockdown triggered pIRF7 degradation in K63-Ub-overexpressing cells (Fig. 4H, Input), and this led to an apparent decreased level of K63-linked ubiquitination of pIRF7 (Fig. 4H, IP: Flag). In cells expressing K48-Ub, which favors pIRF7 degradation, the lower expression of pIRF7 was not further reduced upon TRIM8 knockdown, and no obvious difference in ubiquitination level was observed. Together, these results suggested that pIRF7 polyubiquitination is unlikely to be mediated by TRIM8.

The E3 ubiquitin ligase activity of TRIM proteins is conferred by their RING domain. Therefore, to further demonstrate that the presumed E3 ubiquitin ligase activity of TRIM8 is not implicated in the stabilization of pIRF7, we tested a mutant of TRIM8 in which four of seven cysteine residues that constitute the RING finger domain have been mutated (TRIM8 C4S mutant). As anticipated from the above ubiquitination experiments, the TRIM8 C4S mutant was still able to stabilize pIRF7, thus indicating that TRIM8 acts through an E3 ubiquitin ligase-independent mechanism (Fig. 4I).

TRIM8 prevents Pin1-induced degradation of pIRF7

Although it is unusual to identify a TRIM protein that regulates innate immune signaling independently of its E3 ubiquitin ligase activity, alternative mechanisms have been reported for TRIM21 (24) and TRIM19 (25), which enhance type I IFN expression by preventing

the recognition of pIRF3 by Pin1 (26). Pin1 is a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase that specifically recognizes phosphorylated Ser/Thr-Pro motifs and catalyzes the isomerization of the peptide bond, thus affecting the fate of phosphoproteins and, in consequence, the amplitude and duration of biological responses (27).

Because IRF7 has not been described as a Pin1 substrate, we focused on determining whether Pin1 can bind to pIRF7 in cells and how this interaction affects pIRF7 function. First, we found that pIRF7 coimmunoprecipitated with Pin1 when both proteins were overexpressed in HEK293T cells, suggesting that pIRF7 could be a Pin1 substrate (Fig. 5A). This was further confirmed by functional experiments, because the knockdown of Pin1 led to a marked accumulation of pIRF7 in cells transfected with the phosphomimetic mutant (Fig. 5B) and increased the amount of endogenously IFN-induced pIRF7 following SeV infection (Fig. 5, C and D). Last, we showed that Pin1 silencing also potentiated the expression of IFN- α and IFN- β transcripts in HIV-stimulated primary pDCs (Fig. 5E). Together, these results suggested that Pin1 can promote a shutdown of IFN expression by inducing pIRF7 degradation, as previously described for pIRF3 (26).

Having established that pIRF7 is a Pin1 substrate, we tested whether TRIM8 might stabilize pIRF7 by preventing its Pin1-induced degradation. Because we showed that both TRIM8 (Fig. 4E) and Pin1 (Fig. 5A) can bind to pIRF7, we first asked whether these can attach simultaneously or rather compete with each other for binding to pIRF7. We performed competition experiments between TRIM8 and Pin1 to bind pIRF7 by transfecting increasing amounts of TRIM8 in Pin1- and pIRF7-expressing HEK293T cells. Increasing TRIM8 predictably intensified the pIRF7 band but diminished the amount of Pin1 that was coimmunoprecipitated with pIRF7 (Fig. 6A), while silencing of TRIM8 allowed a better interaction between Pin1 and pIRF7 (Fig. 6B), which combined indicated that TRIM8 interferes with the ability of Pin1 to associate with pIRF7.

To determine which domain of TRIM8 was implicated, we tested a series of TRIM8 deletion mutants for the ability to pull down pIRF7. All mutants maintained the capacity to bind pIRF7 and Pin1 with the notable exception of the TRIM8 Δ RING mutant, indicating that the RING domain was implicated in its interaction with pIRF7 (Fig. 6C). Accordingly, the Δ RING mutant lost the ability to stabilize pIRF7 in cotransfection experiments, confirming that the propensity of TRIM8 to bind pIRF7 is responsible for its ability to stabilize it (Fig. 6D).

Last, to confirm the mechanism of action of TRIM8 in more physiologically relevant cells, we investigated the fate of pIRF7 in primary monocyte-derived DCs (MoDCs) upon SeV infection. We show that, whereas Pin1 and TRIM8 interact in inactivated cells, this interaction is lost upon viral-induced phosphorylation of IRF7 in favor of a pIRF7-TRIM8 interaction (Fig. 6E). Furthermore, as already shown in HEK293T cells, we confirm in MoDCs that TRIM8 knockdown diminished the amount of pIRF7 but favored its interaction with Pin1 (Fig. 6F). These observations performed on endogenous proteins in primary cells further confirm that TRIM8 protects pIRF7 from Pin1 recognition and subsequent degradation.

TRIM8 knockdown diminishes the IFN response in a zebrafish model of chikungunya virus infection

To confirm the role of TRIM8 in an *in vivo* context, we turned to zebrafish using the chikungunya virus (CHIKV) infection model, which has been shown to induce a strong type I IFN response (28). In the absence of a functional adaptive immune system during the first week

of embryonic development, the immune protection of zebrafish larva exclusively relies on innate immunity, which makes them a model of choice to study antiviral innate immunity. Furthermore, zebrafish have orthologs of both IRF7 and Pin1 (29, 30). To facilitate the quantification of IFN responses in this model host, we generated a new transgenic reporter zebrafish line, with a membrane-targeted mCherry under the control of the zebrafish *MXA* promoter.

The zebrafish genome contains two TRIM8 co-orthologs named *trim8a* and *trim8b* (31). To assess them functionally, we designed antisense morpholinos (MOs) targeting essential splice sites. Injection of either of these MOs to one-cell stage had no visible impact on larval development, yet efficient knockdown was achieved for both genes (fig. S2).

We injected Tg(*MXA*:mCherry) reporter larvae with either *trim8*-specific MOs and infected them with CHIKV-GFP (green fluorescent protein) at 3 dpf (days postfertilization). Imaging larvae after 48 hours revealed the expected strong induction of the *MXA* reporter, particularly in the liver and gut, consistent with previous ISG expression patterns (Fig. 7A) (28). While *trim8a*-depleted larvae showed a response of the same magnitude as controls, the reporter induction was reduced by half in *trim8b*-depleted larvae (Fig. 7, A and B). Because the IFN response is required for zebrafish larvae to resist CHIKV infection (32), we measured disease scores at 72 hours after infection. We observed that *trim8b* morphants, but not *trim8a* morphants, were significantly sicker than controls (Fig. 7C).

Viral burden, as measured by qPCR or GFP fluorescence, tended to be higher in *trim8b* morphants, but this did not reach statistical significance. We reasoned that this could be due to a compensatory effect, as zebrafish larvae express two type I IFN genes in response to CHIKV, *ifnphi1* and *ifnphi3* (28). We found that *trim8b* knockdown preferentially affected *ifnphi1* mRNA levels compared to *ifnphi3* (Fig. 7D), thus suggesting that *ifnphi3*-null zebrafish mutants would provide a more appropriate background to test the impact of *trim8b* knockdown on viral infection. We therefore injected control or *trim8b* MOs in homozygous *ifnphi3*-null zebrafish mutant and infected them with CHIKV-GFP. While *ifnphi3*^{-/-} fish injected with a control MO still resisted the infection, the *trim8b*-depleted ones had a significantly higher disease score (Fig. 7E), reminiscent of IFN α -deficient larvae (32), and a significantly higher viral burden, as measured by GFP fluorescence (Fig. 7, F and G) or RT-qPCR (Fig. 7H). These results indicate that *in vivo*, in the developing zebrafish, TRIM8B positively regulates type I IFN responses and contributes to resistance to viral infection.

DISCUSSION

Over the past decade, an abundant literature described the involvement of various TRIM proteins as positive or negative regulators of innate signaling pathways, leading to the expression of IFNs and inflammatory cytokines (9, 10, 12). Very few studies, however, evaluated their implication in relevant human primary innate immune cells (11).

To evaluate whether some TRIM proteins are key regulators of the IFN response *in vivo*, we decided to investigate the consequences of their knockdown on the most relevant cell type, namely, pDCs, which are professional type I IFN producer cells.

We conducted a systematic transcriptional profiling of 75 TRIM genes in human primary pDCs in steady-state conditions and upon viral activation, and performed an siRNA screen on relevant candidates. The expression profiles that we obtained revealed that only

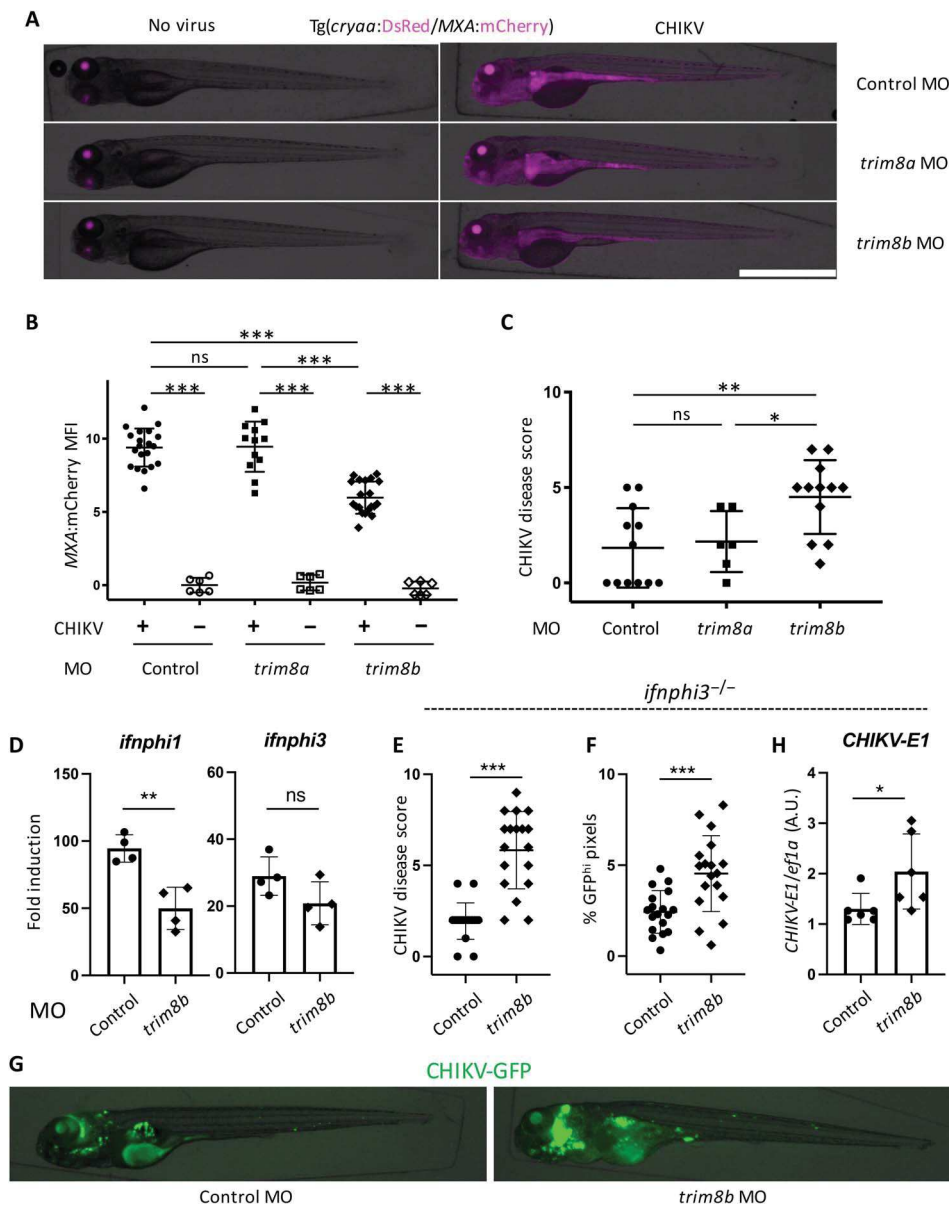


Fig. 7. *trim8b* positively regulates type I IFN responses in zebrafish. (A) *MXA* reporter zebrafish embryos were injected at the one-cell stage with control, *trim8a*-targeting, or *trim8b*-targeting morpholinos (MOs) and, at 3 dpf, inoculated or not with CHIKV. After 48 hours, larvae were imaged with a fluorescence microscope. Images are of the lateral view, dorsal to top, anterior to left, and merge of transmitted light image (gray) with red fluorescence (magenta). The red signal in the lens is due to the secondary *cryaa:DsRed* reporter to identify transgene carriers. Scale bar, 1 mm. (B) Corresponding quantification of *MXA* reporter signal. Mean red fluorescence intensity (MFI) was measured posterior to the eyes; average background fluorescence from control larvae was subtracted before plotting the data. (C) Disease score assessed 3 days after CHIKV inoculation. (D) RT-qPCR measurement of type I IFN gene expression in MO-injected, CHIKV-infected wt larvae 40 hours after infection, displayed as fold induction over uninfected control larvae. (E to H) Outcome of CHIKV-GFP infection in MO-injected *ifnphi3^{-/-}* larvae: (E) disease score 3 days after infection; (F) infection level 3 days after infection, quantified by GFP fluorescence, with two representative images shown in (G) as a merge of transmitted light and green fluorescence; (H) RT-qPCR assessment of *CHIKV-E1* transcripts 40 hours after infection. Means \pm SD are provided over individual data points. A.U., arbitrary units. (B and C) ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was performed. (D to F and J) Unpaired *t* tests were performed. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

a small fraction of *TRIM* genes are expressed in resting pDCs. Similarly, although a large proportion of *TRIM* genes were reported to be induced by IFNs in immune cells (33, 34), here we found that only a limited number of them were actually turned on by RNA viruses in primary pDCs. Hence, the profiling of *TRIM* expression patterns in pDCs allowed us to better appreciate which family members might be implicated in the IFN response in vivo. In particular, we identified five *TRIM* proteins that potentially regulated IFN response in pDCs by

either suppressing signaling downstream of TLR7 (TRIM20, 22, 28, and 36) or promoting IFN production (TRIM8).

Some hits that were obtained here corroborate previous results obtained in cell lines. For instance, TRIM28 was previously found to inhibit IRF7 by promoting its SUMOylation in HEK293T cells (35). However, neither TRIM38, which was found to promote TRAF6 degradation in murine macrophages (16), nor TRIM21, which was involved in the inhibition of IRF7-driven IFN- α induction in HEK293T

(15), was identified as negative regulators of IFN expression in our pDC screen. Conversely, none of the four TRIM proteins that we identified as potent negative regulators in pDCs (TRIM20, 22, 28, and 36) were found to regulate innate immune response when overexpressed in HEK293T cells (11). The different cell types or stimulations that were used might explain the discordant phenotypes, and experiments in human pDCs may more closely reflect the IFN response in vivo.

TRIM8 was the only TRIM protein that we found to act as a positive regulator of innate immune signaling in human pDCs. IFN response in TRIM8-silenced cells was reduced at comparable levels to IRF7 knockdown cells, thus suggesting that TRIM8 is not only a positive regulator but also an essential cofactor of IRF7. Thus, our results identified TRIM8 as the first TRIM protein whose expression is crucial for pDCs to mount an efficient antiviral innate response. Despite the recent profusion of research on TRIM proteins, the only other example of a TRIM family member playing an essential role on an innate immune pathway is TRIM25, a key regulator of RIG-I signaling (36).

TRIM8, also known as GERP, for glioblastoma-expressed RING finger protein (37), is a highly conserved protein implicated in many biological processes, including carcinogenesis and inflammation (38–41). In particular, TRIM8 was found to regulate various signaling pathways through direct interaction with key effectors including SOCS-1 (42), PIAS3 (43), or TAK1 (41). TRIM8 knockout mice were recently shown to exhibit exacerbated innate immune and inflammatory responses following TLR3 or TLR4 activation, thus suggesting that TRIM8 could also play a negative role on TLR3/4 downstream signaling pathways (44).

Using a zebrafish model of CHIKV infection, we showed here that the human TRIM8 ortholog TRIM8B is also an important mediator of IFN response in a teleost fish. Our in vivo loss-of-function approach corroborates previous findings based on in vitro overexpression assays in another fish species (45). This role of TRIM8 is thus evolutionary ancient, highlighting its significance. Although IRF7 has a unique ortholog in fish, the existence of pDCs in adult fish is still uncertain (29). They are known to be absent in larvae, where their key IFN-expressing role is taken up by neutrophils (32). *ifnphi1*-expressing zebrafish larval neutrophils express *irf7* at a high level, whereas *ifnphi3* is preferentially induced in nonhematopoietic cells (32). The fact that the impact of *trim8b* knockdown is stronger on *ifnphi1* than on *ifnphi3* induction is consistent with an *irf7*-dependent function of TRIM8B, although further work will be required to formally determine whether TRIM8 expression and activity is restricted to specific IFN-expressing cell types in fish.

In primary human pDCs, we showed that TRIM8 knockdown inhibits virus-induced type I IFN gene expression by reducing the amount of the activated form of IRF7, pIRF7. Because TRIM8 is almost exclusively nuclear, we therefore hypothesized that it may act directly on pIRF7 in the nucleus. We confirmed that TRIM8 colocalizes with pIRF7 in the nucleus of activated pDCs, and further showed that TRIM8 binds to pIRF7 and protects it from proteasomal degradation in HEK293T cells. Surprisingly, although most of the TRIM proteins act through their capacity to promote K48- or K63-linked polyubiquitination of proteins (46), we determined that pIRF7 stabilization by TRIM8 was independent of its putative E3 ubiquitin ligase activity. Our results show that TRIM8 rather protects pIRF7 from degradation by preventing its recognition by Pin1.

Pin1 specifically recognizes phosphorylated Ser/Thr-Pro motifs and catalyzes the isomerization of the peptide bond, thus affecting the function and/or the stability of target proteins (27). Pin1 was identified

as a “molecular switch” that modulates the fate of phosphoproteins and therefore the amplitude and duration of a biological response (27). Although many cellular substrates have been reported for Pin1, particularly oncogenes and tumor suppressor proteins involved in cell cycle regulation, this is a demonstration that pIRF7 is also a Pin1 substrate.

Some interesting parallels with pIRF3 may be derived from our understanding of pIRF7 regulation and are consistent with the high structural homology shared by the two IRF proteins. Our results showed that Pin1 regulates the stability of pIRF7 by promoting its degradation by the proteasome. Similarly, Pin1 also targets pIRF3 (26) and is thought to bring about changes in its conformation that induce its ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome (26). Furthermore, our data revealed that the negative regulation of pIRF7 by Pin1 is kept in check by TRIM8, which competes with Pin1 for binding to pIRF7, hence promoting the stability and activity of pIRF7, as shown in HEK293T as well as in primary MoDCs. Likewise, TRIM19 (promyelocytic leukemia protein, or PML) and TRIM21 were both shown to prevent pIRF3 recognition by Pin1, thus preventing its degradation (24, 25). TRIM19 sequesters Pin1 within PML nuclear bodies (25), whereas the mode of action of TRIM21 may involve preventing the interaction between Pin1 and pIRF3 (24) or promoting the K48 polyubiquitination of pIRF3 (47, 48). Although Pin1 can bind both pIRF3 and pIRF7, the effect of TRIM8 is IRF7 specific and does not promote the stabilization of pIRF3.

As the master regulator of type I IFN response, IRF7 expression and activation are tightly regulated by diverse mechanisms acting on multiple steps of the signaling cascade (18). First, IRF7 is not constitutively expressed in most cell types but only induced upon viral infections. Second, unlike its closest relative IRF3, IRF7 has a very short half-life (49). The only cells that constitutively express high levels of IRF7 are pDCs, but they are very rare and also have a short half-life (50). Last, IRF7 is subjected to multiple layers of regulation, including transcriptional, translational, and posttranslational (18). In particular, phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation, and acetylation of IRF7 have been described as possible controls of its activity and stability (18). However, no mechanism had been identified to regulate the stability of the active form of IRF7, pIRF7, to either promote or shut down its activity. Our work identified Pin1 as a terminator of pIRF7-driven type I IFN production and TRIM8 as a Pin1 competitor that protects pIRF7 from Pin1-induced degradation, thus introducing a new mode of regulation to IRF7-dependent IFN production. While TRIM8 emerged as a necessary mediator of virus-induced IFN response in pDCs, our results show that its expression is eventually down-regulated following viral activation, thus suggesting that TRIM8 is regulated by a negative feedback loop. The complexity of the molecular mechanisms developed by cells to regulate IFN expression highlights the fact that a tight control of IFN production is crucial for the organism (6). Given the key role of IRF7 in IFN response and the unique potency of pDCs to secrete large amounts of IFNs in response to viral infections, it is not surprising to find particularly effective and complex regulation mechanisms in these cells.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

pRK5 plasmids encoding hemagglutinin (HA)-tagged ubiquitin wild-type (wt), K48, and K63 were provided by T. Dawson (Addgene plasmids #17605, #17606, and #17608) (51). Flag-tagged IRF7 wt was purchased from GenScript, and the phosphomimetic Flag-IRF7

(S477D/S479D) was from John Hiscott Pasteur Laboratories (Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti, Rome, Italy) (21). HA-Pin1-expressing plasmid was provided by H.-Y. Kao (Research Institute of University Hospitals of Cleveland, Cleveland, OH). Human full-length TRIM8 complementary DNA (cDNA) was isolated from human cDNA library using standard PCR techniques and was subsequently cloned into pcDNA3.1D/V5-His-TOPO plasmid (Invitrogen). The TRIM8 RING mutant C15S-C18S-C35S-C38S was generated by site-directed mutagenesis using the GeneArt Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific). Myc-GFP-tagged TRIM8 deletion mutants were provided by G. Meroni (Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy).

Viruses

Inactivated AT-2 HIV-1 MN was provided by J. D. Lifson (SAIC-NCI, Frederick, MD) (52) and was used at p24 CA equivalent (60 ng/ml) to activate 5×10^4 human pDCs. Infectious human influenza A/Victoria/3/75 (H3N2) virus was used at 1 plaque-forming unit (PFU)/cell to activate pDCs. For IAV infection of human PBMCs (Fig. 3G), we used the IAV Victoria-NanoLuc reporter virus, which has been previously described (53). Briefly, the porcine teschovirus P2A sequence and the NanoLuc luciferase gene were introduced in the A/Victoria/3/75 polymerase acidic protein gene. IAV challenges of PBMCs were performed using 2.5×10^4 PFU/well of virus (corresponding to a multiplicity of infection of 0.28). Defective-interfering H4 SeV was provided by D. Garcin (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland) and used at 50 hemagglutination units (HAU)/ml (20).

Antibodies

Primary antibodies used in Western blot and IP experiments were rat anti-HA clone 3F10 (Sigma-Aldrich), mouse anti-Flag clone M2 (Sigma-Aldrich), mouse anti-V5 Tag (Thermo Fisher Scientific), mouse anti-TRIM8 (Santa Cruz Biotechnology, sc-398878), mouse anti-IRF7 clone G-8 (Santa Cruz Biotechnology, sc-74472), rabbit anti-pIRF7 (Ser⁴⁷⁷) clone D7E1W (no. 12390, Cell Signaling), rabbit anti-ubiquitin (linkage-specific K63) clone EPR8590-448 (Abcam), rabbit anti-Pin1 (no. 3722, Cell Signaling), and mouse anti- β -actin (Sigma-Aldrich). Secondary antibodies used were anti-mouse, anti-rat, and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (GE Healthcare Life Sciences).

For immunofluorescence and flow cytometry, we used Alexa Fluor 488 mouse anti-IRF7 (pS477/pS479) clone K47-671 (BD Biosciences), mouse anti-IFN- α phycoerythrin (PE) clone LT27:295 (Miltenyi Biotec), mouse allophycocyanin (APC) anti-BDCA-4 clone REA380 (Miltenyi Biotec), mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-CD123 clone AC145 (Miltenyi Biotec), and rabbit anti-TRIM8 (Thermo Fisher Scientific) antibodies. Secondary antibody (for TRIM8 labeling) was Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific).

Immunoprecipitations

Cells were lysed in IP lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cell lysates were incubated overnight at 4°C with anti-Flag M2, anti-HA, or anti-c-Myc agarose affinity gel antibody (Sigma-Aldrich) or anti-IRF7 or anti-Pin1 antibodies and protein G Sepharose beads (Thermo Fisher Scientific). Beads were washed three times and eluted with 2 \times SDS loading buffer. For immunoblotting, proteins were re-

solved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane.

Blood samples, isolation, and culture of human primary cells

Blood from healthy HIV-1-seronegative blood donors was obtained from “Etablissement Français du sang” (EFS Pyrénées-Méditerranée, convention #21PLER2016-0083, and EFS Cabanel, convention #07/CABANEL/106). PBMCs were isolated by density centrifugation with Lymphoprep medium (STEMCELL Technologies). pDCs were purified by negative selection using the Human Plasmacytoid DC Enrichment Kit (STEMCELL Technologies). Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco). After purification, purity of pDCs was higher than 90%.

For experiments on MoDCs, monocytes were isolated from PBMCs using CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Usual purity was >95% CD14⁺. Human MoDCs were generated by incubating purified monocytes in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml), 10 mM HEPES, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and cytokines GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (500 IU/ml) and IL-4 (interleukin-4) (500 IU/ml) (both from Miltenyi Biotec). The obtained immature MoDCs were harvested at days 5 and 6 and phenotyped by flow cytometry before experimental use.

RNA silencing

All siRNAs were purchased from Dharmacon as pools of four individual siRNAs (ON-TARGETplus SMARTpool). Transfections of pDCs with siRNA were performed using DOTAP (Sigma-Aldrich), as previously described (17). Transfections of siRNA into HEK293T cells were performed using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Transfection of MoDCs with siRNA was performed using INTERFERin (Polyplus-transfection), according to the manufacturer's recommendations.

Quantification of secreted IFN

Total IFN secreted by pDCs was titrated on STING-37 reporter cells, which correspond to HEK293 cells stably expressing an IFN-stimulated response element (ISRE)-luciferase reporter gene (54). A standard curve was established by applying known titers of recombinant human IFN- α 2a (R&D Systems) onto STING-37 cells. Luciferase induction in STING-37 cells was determined using the Bright-Glo reagent (Promega), according to the manufacturer's recommendations. Quantification of individual IFN subtypes (IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1, and IFN- λ 2/3) was performed using the LEGENDplex Kit from BioLegend (human antiviral response panel), according to the manufacturer's recommendations.

Cell culture and transfections

HEK293T cells were obtained from the American Type Culture Collection. HEK293T and STING-37 cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FCS, supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Transient plasmid transfections were performed using FuGENE 6 (Promega), following the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence

Purified pDCs were washed in ice-cold 0.2% phosphate-buffered saline-bovine serum albumin (PBS-BSA), plated on poly-D-lysine-coated

slides, and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with 90% ice-cold methanol for 5 min at -20°C and, after washing, incubated with Alexa Fluor 488 mouse anti-IRF7 (pS477/pS479) and rabbit anti-TRIM8 antibody in saturation buffer PBS-BSA (0.5%) for 1 hour. Cells were then washed in saturation buffer and incubated with secondary antibody anti-mouse-AF488 and anti-rabbit-AF546 for 30 min at 4°C . Last, slides were washed in PBS and mounted in Fluoromount-G with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) medium (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired using a Zeiss LSM 710 confocal microscope equipped with a PL APO 63 \times /1.4 oil objective. All analyses were performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Mander's coefficients were calculated using the JACoP plug-in in ImageJ.

RT-qPCR profiling

We designed custom RT² Profiler PCR arrays (Qiagen) to quantify simultaneously the expression of 75 human TRIM genes, 33 control genes (including IFNs, known ISGs, cytokines, and chemokines), and 6 housekeeping genes. The complete list of the 114 screened transcripts is shown in Table 1.

Briefly, total RNA from pDCs isolated from three blood donors and incubated or not for 16 hours with either HIV-1 or IAV was reverse-transcribed using the RT² First Strand Kit (Qiagen). PCRs were performed using the RT² Realtime SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen), following the manufacturer's instructions on a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics). Relative expression of each target transcript was normalized to the geometric mean of the six housekeeping genes (*SDHA*, *PP1B*, *TBP*, *POLR2A*, *PPIA*, and *B2M*) and following the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Other RT-qPCR analyses

Total RNA was extracted using an RNeasy Micro kit and submitted to deoxyribonuclease (DNase) treatment (Qiagen), following the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific). RNA (500 ng) was reverse-transcribed with both oligo dT and random primers using the PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara) in a 10- μl reaction. Real-time PCRs were performed in duplicate using Takyon Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) on an Applied Biosystems QuantStudio 5 instrument. Transcripts were quantified using the following program: 3 min at 95°C followed by 35 cycles of 15 s at 95°C , 20 s at 60°C , and 20 s at 72°C . Values for each transcript were normalized to expression levels of RPL13A (60S ribosomal protein L13a) using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. Primers used for quantification of transcripts by real-time qPCR were indicated as follows: RPL13A, 5'-AACAGCTCATGAGGCTACGG-3' (forward) and 5'-TGGGTCTTGAGGACCTCTGT-3' (reverse); IFN- α 2, 5'-CTTGACTTGCAGCTGAGCAC-3' (forward) and 5'-GCTCACCATTTCACCAGT-3' (reverse); IFN- β , 5'-TGCTCTCCTGTTGTGCTTCTC-3' (forward) and 5'-CAAGCCTCCCATTCAATTGCC-3' (reverse); TRIM8, 5'-CTGCCGTGCAAACAACACTTC-3' (forward) and 5'-TCCACGATGTTGGTGAGCTTC-3' (reverse); Pin1, 5'-GAGAAGATCACCCGGACCAA-3' (forward) and 5'-AAAGTCCTCCTC-3' (reverse).

RT-qPCR in zebrafish: Each point in Fig. 7 (D and H) corresponds to an individual larva. Expression levels of each transcript were normalized to expression levels of *Ef1a*. The following primer sequences were used, as previously described in (32): *Ef1a*, 5'-GCTGATCGTTGAGTCAACA-3' (forward) and 5'-ACAGACTTGACCTCAGTGGT-

3' (reverse); *Ifnphi1* (secreted isoform), 5'-TGAGAACTCAAATGTGGACCT-3' (forward) and 5'-GTCCCTCCACCTTTGACTTGT-3' (reverse); *Ifnphi3*, 5'-GAGGATCAGGTTACTGGTGT-3' (forward) and 5'-GTTCATGATGCATGTGCTGTA-3' (reverse); CHIKV-E1 (degenerate to be indifferent to silent mutations), 5'-AARTGYGCNGTNCATVCNATG-3' (forward) and 5'-CCNCCNGTDATYTT-YTGNACCCA-3' (reverse).

Flow cytometry

For surface staining of BDCA-4 and CD123, pDCs were washed with PBS and incubated for 30 min at 4°C with a viability stain (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, BioLegend). Cells were washed with magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer (PBS, 2% fetal bovine serum, and 2 mM EDTA) and incubated for 30 min at 4°C with the appropriate antibodies or with the corresponding isotype control antibodies (5 mg/ml each) in MACS buffer containing Fc receptor blockers (BD Biosciences, San Jose, CA).

For intracellular IFN staining, cells were treated with brefeldin A (BFA) at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the last 12 hours. Cells were fixed using 2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. After washing the cells with MACS buffer containing 0.1% saponin (Sigma-Aldrich), cells were stained for 1 hour at 4°C in MACS buffer containing 0.1% saponin.

For intranuclear pIRF7 staining, cells were fixed with Fix Buffer I and permeabilized with Perm Buffer III (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions. After washing the cells with MACS buffer, cells were stained for 1 hour at 4°C .

Flow cytometry analyses were performed on a BD FACSCanto II flow cytometer using flow cytometry (Diva software, BD Biosciences, San Jose, CA). FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) was used to analyze data.

Generation of transgenic MXA reporter zebrafish

The zebrafish *MXA* promoter used to drive the specific expression of membrane-targeted mCherry in cells responding to type I IFN signaling was amplified using the upstream primer zMXAP1 (5'-CTAAGATCGAAGCCATCAAGCA-3') and the zMXAE1N primer matching the start codon of the *MXA* gene (5'-ATAAGCGGCC-GCTCTCCATCCTTAATAATGTCCAA-3'). The 4.4-kb amplified fragment was digested by Not I and ligated to the coding phase of the farnesylated mCherry protein so that the *MXA* AUG is in phase with the downstream mCherry-F open reading frame on a I-Sce I meganuclease and Tol2-derived vector pTol2crystDsRedBNmCF, which includes an α -crystallin promoter-driven DsRed transgene to facilitate identification of transgene carriers. The resulting plasmid was injected, together with I-Sce I meganuclease (55), into embryos at the one-cell stage. Three independent transgenic lines from distinct founders were selected on the basis of red fluorescent protein (RFP) expression in lenses. When injected with recombinant zebrafish type I IFN (IFN ϕ 1), all three lines responded in a dose-dependent manner with a similar, gut-preponderant pattern of mCherry expression, although one line displayed a distinctly mosaic expression even at the F2 generation (not shown). We selected the line with the strongest homogeneous reporter expression for further studies to obtain the TG(cryaa:DsRed/MXA:mCherry-F)^{umpp7} transgenic line.

Generation of *ifnphi3* mutant zebrafish

The first exon of the *ifnphi3* gene was edited using CRISPR technology. A guide RNA targeting the sequence TGGACCTTCACCGTGTGGC-C(TGG) and recombinant CAS9 protein (both from TACGene, France)

were coinjected in one-cell stage eggs of wt AB zebrafish. F0 animals were raised to adulthood and backcrossed to AB. One F0 founder was found to transmit a mutated allele of *ifnphi3* in which the sequence tcaga(ATG)GACCTTCACCGTGTGG, encompassing the predicted start codon of *ifnphi3* (in parenthesis), was replaced with ATT. This results in the loss of the first 31 amino acids of the predicted protein, including its leader peptide and the first cysteine involved in a disulfide bridge key for the cytokine structure (56). One F1 fish bearing this allele, designated *ifnphi3^{ip7}*, was backcrossed to AB, and heterozygous F2 males and females were incrossed to generate homozygous *ifnphi3^{ip7/ip7}* F3 fish. These developed normally and grew in viable and fertile adults. F4 *ifnphi3^{ip7/ip7}* mutants were used to produce the eggs used in that study.

Production and infection of trim8 knockdown larvae

We followed previously described methods (57). Briefly, MXA reporter adults were outcrossed with wt AB zebrafish and eggs were injected at the one-cell stage with 1 nl of a 0.5 mM solution of MO (Gene Tools), targeting a trim8a or trim8b splice site (fig. S2) or a control MO with no known target. Eggs were then bleached and incubated in Volvic water at 24° or 28°C, according to the desired speed of development. One day later, 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (Sigma-Aldrich) was added to prevent pigmentation; this was kept for all further steps. When the larvae had reached the 3-dpf stage, they were dechorionated if needed, anesthetized with tricaine (Sigma-Aldrich, A-5040), and inoculated intravenously by targeting the large vessels caudal to the cloaca, with ~200 PFU of CHIKV-GFP, as described in (32). After a rinse, these larvae were maintained at 28°C in individual wells of a 24-well plate and inspected at least daily with a stereomicroscope. Quantitative assessment of the clinical status, performed 3 days after inoculation, was based on a precise list of criteria, as previously described (32). Briefly, clinical signs were assessed blindly, yielding a disease score ranging from 0 (no disease sign) to 15 (dead or terminally ill). The signs evaluated included the following: ability to maintain equilibrium, response to touch, body shape, blood flow, cardiac rhythm, presence of edema, inflation of the swim bladder, and opacity of the yolk.

Quantitative fluorescence imaging of zebrafish

MXA reporter: 2 days after virus inoculation, anesthetized larvae were positioned laterally, left flank toward the objective, and imaged with an EVOS FL Auto microscope (Thermo Fisher Scientific) using a 2× planachromatic objective (numerical aperture, 0.06), allowing capture of the entire larva in a field. Transmitted light and fluorescence (Texas red cube) images were taken. They were further processed (superposition of channels, rotation, crop, and fluorescence intensity measure) using Fiji. A rectangular region of interest (ROI) encompassing all body regions posterior to the eyes was defined to measure transgene-associated fluorescence. **CHIKV-GFP infection:** 3 days after virus inoculation, larvae were mounted as above and imaged with EVOS using transmitted light and GFP fluorescence cubes and processed as described above. The percentage of GFP-positive pixels was determined with Fiji by setting a threshold of intensity yielding <0.02% positive pixels in uninfected controls.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/5/11/eaax3511/DC1>

Fig. S1. TRIM expression and silencing in human primary pDCs.

Fig. S2. Verification of knockdown efficiency in zebrafish.

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
2. K. Honda, H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, T. Taniguchi, IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772–777 (2005).
3. Y. J. Liu, IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275–306 (2005).
4. A. L. Blasius, B. Beutler, Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
5. X. Dagenais-Lussier, H. Loucif, A. Murira, X. Lualhe, S. Stager, A. Lamarre, J. van Grevenynghe, Sustained IFN- λ expression during established persistent viral infection: A “bad seed” for protective immunity. *Viruses* **10**, (2017).
6. G. Trinchieri, Type I interferon: Friend or foe? *J. Exp. Med.* **207**, 2053–2063 (2010).
7. S. Nisole, J. P. Stoye, A. Saib, TRIM family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 799–808 (2005).
8. A. Reymond, G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P. G. Pellicci, A. Ballabio, The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140–2151 (2001).
9. M. van Gent, K. M. J. Sparrer, M. U. Gack, TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses. *Annu. Rev. Virol.* **5**, 385–405 (2018).
10. G. A. Versteeg, S. Benke, A. Garcia-Sastre, R. Rajsbaum, InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 563–576 (2014).
11. G. A. Versteeg, R. Rajsbaum, M. T. Sanchez-Aparicio, A. M. Maestre, J. Valdiviezo, M. Shi, K. S. Inn, A. Fernandez-Sesma, J. Jung, A. Garcia-Sastre, The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* **38**, 384–398 (2013).
12. F. W. McNab, R. Rajsbaum, J. P. Stoye, A. O’Garra, Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 46–56 (2011).
13. A. S. Beignon, K. McKenna, M. Skoberne, O. Manches, I. DaSilva, D. G. Kavanagh, M. Larsson, R. J. Gorelick, J. D. Lifson, N. Bhardwaj, Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115**, 3265–3275 (2005).
14. S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
15. J. A. Young, D. Sermwittayawong, H. J. Kim, S. Nandu, N. An, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L. Coscoy, A. Winoto, Fas-associated death domain (FADD) and the E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 interact to negatively regulate virus-induced interferon production. *J. Biol. Chem.* **286**, 6521–6531 (2011).
16. W. Zhao, L. Wang, M. Zhang, P. Wang, C. Yuan, J. Qi, H. Meng, C. Gao, Tripartite motif-containing protein 38 negatively regulates TLR3/4- and RIG-I-mediated IFN- β production and antiviral response by targeting NAP1. *J. Immunol.* **188**, 5311–5318 (2012).
17. N. Smith, P. O. Vidalain, S. Nisole, J. P. Herbeval, An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: Silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. *Sci. Rep.* **6**, 29891 (2016).
18. S. Ning, J. S. Pagano, G. N. Barber, IRF7: Activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* **12**, 399–414 (2011).
19. M. Sato, N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, N. Tanaka, Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **441**, 106–110 (1998).
20. L. Strahle, D. Garcin, D. Kolakofsky, Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon- β . *Virology* **351**, 101–111 (2006).
21. R. Lin, Y. Mamane, J. Hiscott, Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J. Biol. Chem.* **275**, 34320–34327 (2000).
22. D. Komander, M. Rape, The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
23. K. N. Swatek, D. Komander, Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399–422 (2016).
24. K. Yang, H. X. Shi, X. Y. Liu, Y. F. Shan, B. Wei, S. Chen, C. Wang, TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J. Immunol.* **182**, 3782–3792 (2009).
25. F. El Asmi, M. A. Maroui, J. Dutrieux, D. Blondel, S. Nisole, M. K. Chelbi-Alix, Implication of PMLIV in both intrinsic and innate immunity. *PLoS Pathog.* **10**, e1003975 (2014).
26. T. Saitoh, A. Tun-Kyi, A. Ryo, M. Yamamoto, G. Finn, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, K. P. Lu, S. Yamaoka, Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat. Immunol.* **7**, 598–605 (2006).
27. Y. C. Liou, X. Z. Zhou, K. P. Lu, Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 501–514 (2011).
28. V. Briolat, L. Jouneau, R. Carvalho, N. Palha, C. Langevin, P. Herbomel, O. Schwartz, H. P. Spaink, J. P. Levrard, P. Boudinot, Contrasted innate responses to two viruses in zebrafish: Insights into the ancestral repertoire of vertebrate IFN-stimulated genes. *J. Immunol.* **192**, 4328–4341 (2014).

29. P. Boudinot, C. Langevin, C. J. Secombes, J. P. Levrud, The peculiar characteristics of fish type I interferons. *Viruses* **8**, e298 (2016).
30. M. S. Ibarra, C. Borini Etichetti, C. Di Benedetto, G. L. Rosano, E. Margarit, G. Del Sal, M. Mione, J. Girardini, Dynamic regulation of Pin1 expression and function during zebrafish development. *PLoS ONE* **12**, e0175939 (2017).
31. L. Micale, M.N. Loviglio, M. Manzoni, C. Fusco, B. Augello, E. Migliavacca, G. Cotugno, E. Monti, G. Borsani, A. Reymond, G. Merla, A fish-specific transposable element shapes the repertoire of p53 target genes in zebrafish. *PLoS ONE* **7**, e46642 (2012).
32. N. Palha, F. Guivel-Benhassine, V. Briolat, G. Lutfalla, M. Sourisseau, F. Ellett, C. H. Wang, G. J. Lieschke, P. Herbomel, O. Schwartz, J. P. Levrud, Real-time whole-body visualization of chikungunya virus infection and host interferon response in zebrafish. *PLoS Pathog.* **9**, e1003619 (2013).
33. L. Carthagena, A. Bergamaschi, J. M. Luna, A. David, P. D. Uchil, F. Margottin-Goguet, W. Mothes, U. Hazan, C. Transy, G. Pancino, S. Nisole, Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS ONE* **4**, e4894 (2009).
34. R. Rajsbaum, J. P. Stoye, A. O'Garra, Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 619–630 (2008).
35. Q. Liang, H. Deng, X. Li, X. Wu, Q. Tang, T. H. Chang, H. Peng, F. J. Rauscher III, K. Ozato, F. Zhu, Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.* **187**, 4754–4763 (2011).
36. M. U. Gack, Y. C. Shin, C. H. Joo, T. Urano, C. Liang, L. Sun, O. Takeuchi, S. Akira, Z. Chen, S. Inoue, J. U. Jung, TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916–920 (2007).
37. S. R. Vincent, D. A. Kwasnicka, P. Fretier, A novel RING finger-B box-coiled-coil protein, GERP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 482–486 (2000).
38. M. F. Caratozzolo, F. Marzano, F. Mastropasqua, E. Sbisà, A. Tullo, TRIM8: Making the right decision between the oncogene and tumour suppressor role. *Genes* **8**, 354 (2017).
39. M. F. Caratozzolo, L. Micale, M. G. Turturo, S. Cornacchia, C. Fusco, F. Marzano, B. Augello, A. M. D'Erchia, L. Guerrini, G. Pesole, E. Sbisà, G. Merla, A. Tullo, TRIM8 modulates p53 activity to dictate cell cycle arrest. *Cell Cycle* **11**, 511–523 (2012).
40. D. Tomar, L. Sripada, P. Prajapati, R. Singh, A. K. Singh, R. Singh, Nucleo-cytoplasmic trafficking of TRIM8, a novel oncogene, is involved in positive regulation of TNF induced NF- κ B pathway. *PLoS ONE* **7**, e48662 (2012).
41. Q. Li, J. Yan, A. P. Mao, C. Li, Y. Ran, H. B. Shu, Y. Wang, Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNF α - and IL-1 β -triggered NF- κ B activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 19341–19346 (2011).
42. E. Toniato, X. P. Chen, J. Losman, V. Flati, L. Donahue, P. Rothman, TRIM8/GERP RING finger protein interacts with SOCS-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 37315–37322 (2002).
43. F. Okumura, Y. Matsunaga, Y. Katayama, K. I. Nakayama, S. Hatakeyama, TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.* **123**, 2238–2245 (2010).
44. W. Ye, M. M. Hu, C. Q. Lei, Q. Zhou, H. Lin, M. S. Sun, H. B. Shu, TRIM8 negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune response by blocking TRIF-TBK1 interaction. *J. Immunol.* **199**, 1856–1864 (2017).
45. Y. Huang, Y. Yu, Y. Yang, M. Yang, L. Zhou, X. Huang, Q. Qin, Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling. *Fish Shellfish Immunol.* **54**, 435–444 (2016).
46. R. Rajsbaum, A. Garcia-Sastre, G. A. Versteeg, TRIM8: The roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J. Mol. Biol.* **426**, 1265–1284 (2014).
47. R. Higgs, E. Lazzari, C. Wynne, J. Ni Gabhann, A. Espinosa, M. Wahren-Herlenius, C. A. Jefferies, Self protection from anti-viral responses—Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors. *PLoS ONE* **5**, e11776 (2010).
48. R. Higgs, J. Ni Gabhann, N. Ben Larbi, E. P. Breen, K. A. Fitzgerald, C. A. Jefferies, The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN- β production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J. Immunol.* **181**, 1780–1786 (2008).
49. M. Sato, H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, T. Taniguchi, Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity* **13**, 539–548 (2000).
50. B. Reizis, A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, V. Sisirak, Plasmacytoid dendritic cells: Recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 163–183 (2011).
51. K. L. Lim, K. C. Chew, J. M. Tan, C. Wang, K. K. Chung, Y. Zhang, Y. Tanaka Smith, S. Engelender, C. A. Ross, V. L. Dawson, T. M. Dawson, Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: Implications for Lewy body formation. *J. Neurosci.* **25**, 2002–2009 (2005).
52. J. L. Rossio, M. T. Esser, K. Suryanarayana, D. K. Schneider, J. W. Bess Jr., G. M. Vasquez, T. A. Wiltout, E. Chertova, M. K. Grimes, Q. Sattentau, L. O. Arthur, L. E. Henderson, J. D. Lifson, Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J. Virol.* **72**, 7992–8001 (1998).
53. T. Doyle, O. Moncorge, B. Bonaventure, D. Pollpeter, M. Lussignol, M. Tauziet, L. Apolonia, M. T. Catanese, C. Goujon, M. H. Malim, The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry. *Nat. Microbiol.* **3**, 1369–1376 (2018).
54. M. Lucas-Hourani, D. Dauzonne, P. Jorda, G. Cousin, A. Lupan, O. Helyncik, G. Caignard, G. Janvier, G. Andre-Leroux, S. Khair, N. Escrivo, P. Despres, Y. Jacob, H. Munier-Lehmann, F. Tangy, P. O. Vidalain, Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003678 (2013).
55. V. Thermes, C. Grabher, F. Ristoratore, F. Bourrat, A. Choulika, J. Wittbrodt, J. S. Joly, I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **118**, 91–98.
56. J. Zou, C. Tafalla, J. Truckle, C. J. Secombes, Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J. Immunol.* **179**, 3859–3871 (2007).
57. J. P. Levrud, E. Colucci-Guyon, M. J. Redd, G. Lutfalla, P. Herbomel, In vivo analysis of zebrafish innate immunity. *Methods Mol. Biol.* **415**, 337–363 (2008).

Acknowledgments: We are grateful to G. Meroni, P. O. Vidalain, J. Hiscott, D. Garcin, and B. Jahrsdörfer for providing invaluable materials. Furthermore, we personally thank J. Bess and J. Lifson for providing us with the inactivated purified HIV-1 viruses. We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investissements d’avenir”). These experiments used reagents provided by the AIDS and Cancer Virus Program, Biological Products Core Laboratory, Frederick National Laboratory for Cancer Research, supported with federal funds from the National Cancer Institute, NIH, under contract HHSN261200800001E. **Funding:** This work was supported by Labex EpiGenMed, an Investissements d’avenir program (ANR-10-LABX-12-01 to N.J.A. and S.N.); the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites virales, ANRS (AO2017-1 to J.-P.H.); the European Community’s Seventh Framework Program (FP7- PEOPLE-2011-ITN) under the Marie-Curie Initial Training Network FishForPharma (PITN-GA-2011-289209 to G.L.); the European Community’s H2020 Program Marie-Curie Innovative Training Network ImagenLife (721537 to G.L. and J.-P.L.); the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE20-0002-03 and ANR-10-MDI-009 to J.-P.L.); and the Région Occitanie (REPERE2017ImagenLife to G.L.). G.M. (AO2018-2), N.S. (AO2016-1), O.M. (AO2017-1), and S.M. (AO2017-2) were supported by grants from the ANRS. This work received help and expertise from TACGene, which is supported by the program Investissement d’avenir TEFOR (ANR-II-INSB-0014). N.S. acknowledges support from the European Molecular Biology Organization EMBO for Fellowship (LT-834-2017), the start-up funding program “Baustein” of the Medical Faculty of Ulm University (LSBN.0147), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (SM 544/1-1). **Author contributions:** S.N. conceived the study. G.M., N.S., J.-P.H., J.-P.L., and S.N. designed the experiments. G.M., N.S., S.M., O.M., C.C., F.P.B., J.-P.L., N.J.A., and S.N. performed the experiments. G.M., N.S., J.-P.L., N.J.A., and S.N. analyzed and interpreted data. O.M., J.E., F.S., G.L., J.-P.L., and S.N. provided tools and expertise. N.J.A. and S.N. wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data are available from authors upon request. The zebrafish lines (MXA:mCherry transgenic reporter of ifn β 3-null mutant) can be provided by Institut Pasteur pending scientific review and a completed material transfer agreement. Requests should be submitted to J.-P.L. (jean-pierre.levrud@pasteur.fr).

Submitted 15 March 2019
Accepted 20 September 2019
Published 20 November 2019
10.1126/sciadv.aax3511

Citation: G. Maarifi, N. Smith, S. Maillet, O. Moncorgé, C. Chamontin, J. Edouard, F. Sohm, F. P. Blanchet, J.-P. Herbeuval, G. Lutfalla, J.-P. Levrud, N. J. Arhel, S. Nisole, TRIM8 is required for virus-induced IFN response in human plasmacytoid dendritic cells. *Sci. Adv.* **5**, eaax3511 (2019).

TRIM8 is required for virus-induced IFN response in human plasmacytoid dendritic cells

Ghizlane Maarifi, Nikaïa Smith, Sarah Maillet, Olivier Moncorgé, Célia Chamontin, Joanne Edouard, Frédéric Sohm, Fabien P. Blanchet, Jean-Philippe Herbeuval, Georges Lutfalla, Jean-Pierre Levrault, Nathalie J. Arhel and Sébastien Nisole

Sci Adv 5 (11), eaax3511.
DOI: 10.1126/sciadv.aax3511

ARTICLE TOOLS	http://advances.sciencemag.org/content/5/11/eaax3511
SUPPLEMENTARY MATERIALS	http://advances.sciencemag.org/content/suppl/2019/11/18/5.11.eaax3511.DC1
REFERENCES	This article cites 55 articles, 17 of which you can access for free http://advances.sciencemag.org/content/5/11/eaax3511#BIBL
PERMISSIONS	http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science Advances (ISSN 2375-2548) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2019 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).

Inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par la protéine Daxx

Daxx (Death domain-associated protein 6), est une protéine multifonctionnelle exprimée de façon ubiquitaire majoritairement dans le noyau des cellules, où il se trouve associé aux corps nucléaires formés par la protéine PML. En 2015, l'équipe a identifié Daxx comme un facteur de résistance à certains rétrovirus, dont le VIH-1. Daxx cible plus précisément la transcription inverse du VIH-1, une étape essentielle et spécifique du cycle de réplication des rétrovirus, au cours de laquelle le génome viral sous forme ARN est converti en un ADN double brin capable de s'intégrer au génome de l'hôte. Les travaux que nous avons entrepris avaient pour but d'élucider le mécanisme de restriction imposé par Daxx, notamment en identifiant les partenaires impliqués dans cette activité antivirale. Nous avons d'abord montré que la région SIM localisée en C-terminale de Daxx, un domaine qui lui permet d'interagir avec des protéines SUMOylées, était nécessaire à sa fonction inhibitrice. Après différentes mises au point, un crible protéomique complété d'expériences d'immunoprécipitation ont montré que Daxx s'associe aux particules virales entrantes par l'intermédiaire d'une interaction avec la cyclophiline A dépendante de la région SIM de Daxx. Cette interaction est à l'origine de la formation d'un complexe multiprotéique également constitué de TRIM5 α , TRIM34 et TNPO3. Sachant que certains de ces facteurs influencent la stabilité de la capsid d'une part, et que la transcription inverse est étroitement liée à l'étape de décapsidation, nous nous sommes interrogés sur l'implication de Daxx dans la stabilité des capsides. Nous avons ainsi montré que Daxx stabilise les capsides virales de manière SIM-dépendante. Nos résultats suggèrent que Daxx, en s'associant à la CypA liée aux capsides entrantes par l'intermédiaire de son motif SIM, recrute d'autres partenaires comme TRIM5 α , TRIM34 ou TNPO3, ce qui provoque la stabilisation des capsides et empêche la décapsidation et la transcription inverse.

Daxx-mediated inhibition of HIV-1 reverse transcription

Daxx is a multifunctional ubiquitously expressed protein, mainly found in the nucleus, where it associates with nuclear structures called PML nuclear bodies. In a previous study, the team showed that antiviral effect of PML was not direct and identified Daxx as a novel restriction factor which interferes with an early step of HIV-1 and other retroviruses replication cycle. Daxx indeed targets the reverse transcription, an essential step responsible for the RNA viral genome conversion in a double stranded DNA that can integrate in the cellular host genome. In order to decipher the mechanism underlying Daxx-mediated inhibition of HIV-1 reverse transcription, we sought to identify Daxx's partners involve in this antiviral activity. We first showed that the C-terminus domain of Daxx called SIM, for SUMO-interacting motif, was required for its antiviral activity. A proteomic screen combined with biochemical approaches showed that Daxx associates with incoming viral cores in a SIM-dependant interaction with cyclophilin A (CypA). Daxx is found in a multiprotein complex associated with incoming viral particles and containing TRIM5 α , TRIM34 and TNPO3. Knowing that some of these factors influence HIV-1 core stability, we investigated the effect of Daxx on the fate of incoming viral particles, and showed that Daxx interferes HIV-1 uncoating in a SIM-dependant manner. Altogether, our findings suggest that Daxx interacts with CypA associated with viral capsids to recruit a multiprotein complex containing TRIM5 α , TRIM34 and TNPO3 in order to stabilize the viral cores thus preventing uncoating and reverse transcription.